

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 00/6139



REC'D 28 SEP 2000

WIPO PCT

4

X2

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****PRIORITY DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)**Aktenzeichen:**

199 30 177.8

Anmeldetag:

30. Juni 1999

Anmelder/Inhaber:SYNTESOME Gesellschaft für medizinische
Biochemie GmbH, München/DE**Bezeichnung:**Intermolekular assoziierende Verbindungen und
diese umfassende Aggregate**IPC:**

C 08 B, C 07 H, C 12 N



Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag



Zusammenfassung

Verbindung der allgemeinen Formel (I)



wobei

X für eine m-wertige Einheit steht und die

B gleich oder verschieden sind und für K-R stehen,
wobei

K für eine zweiwertige Molekülkette, und

R für Wasserstoff, einen zur spezifischen Bindung an einen
Rezeptor geeigneten Liganden, ein Marker-Molekül oder eine
katalytisch aktive Gruppe steht, und

m mindestens 2 ist,

mit der Maßgabe, dass

(1) in der Verbindung mindestens ein R nicht Wasserstoff ist,

(2) mindestens zwei K vorliegen, und

(3) X, die B und m so gewählt sind, dass eine intermolekulare
Assoziation der K in flüssiger Phase unter Ausbildung von
Aggregaten, die auf der Oberfläche mehrere R präsentieren, die nicht
Wasserstoff sind, möglich ist, und

(4) die Molmasse des Fragments $X(K)_m$ weniger als 20.000 beträgt,

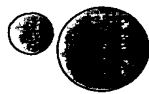
sowie Aggregate aus solchen Verbindungen insbesondere zur Anwendung bei
therapeutischen und diagnostischen Verfahren.

Intermolekular assoziierende Verbindungen und diese umfassende Aggregate

Die vorliegende Erfindung betrifft spezielle niedermolekulare Verbindungen, die geeignet sind durch intermolekulare Assoziation Aggregate zu bilden. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Aggregate, die solche Verbindungen umfassen, sowie Verfahren zur Herstellung solcher Aggregate. Ferner betrifft die Erfindung spezielle Verwendungen der Verbindungen und Aggregate, insbesondere für therapeutische und diagnostische Zwecke.



Die simultane und spezifische Assoziation von mindestens zwei Liganden mit entsprechenden Rezeptoren führt zu multivalenten Wechselwirkungen zwischen zwei Einheiten, die diese Liganden bzw. Rezeptoren tragen. Derartige multivalente Wechselwirkungen sind in der Biologie sehr weit verbreitet, wobei die wechselwirkenden Einheiten Liganden, wie Oligosaccharide, Proteine, Nucleinsäuren, oder Lipide aufweisen können. Multivalente Wechselwirkungen sind gekennzeichnet durch eine Vielzahl von einzelnen schwachen monovalenten Bindungen, die in biologischen Systemen häufig gegenüber einer einzigen starken monovalenten Bindung bevorzugt sind (M. Mammen, S-K. Choi, G. M. Whitesides, Angew. Chemie, **110**, 2908, 1998).



In biologischen Systemen werden multivalente Wechselwirkungen häufig dann ausgebildet, wenn Bindungen zwischen Einheiten mit wenig affinen Liganden und Rezeptoren ausgebildet werden. Bekannte Beispiele für Wechselwirkungen zwischen wenig affinen Liganden und Rezeptoren sind Kohlenhydrat-Protein- und Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen (A. Danguy, K. Kayser, N. V. Bovin, H.-J. Gabius, Trends Glycosc. Glycotech., **7**, 261, 1995), die beispielsweise bei viralen und bakteriellen Infektionen, bei der Einleitung von Entzündungsprozessen, bei der Tumor-Metastasierung oder bei der Immunerkennung eine entscheidende Rolle spielen.

Natürliche multivalente Wechselwirkungen können insbesondere zu therapeutischen und diagnostischen Zwecken blockiert werden. Für die in-vitro Blockierung derartiger multivalenter Wechselwirkungen sind bisher sowohl monovalente als auch multivalente Inhibitoren eingesetzt worden.

Bei Derivaten von natürlichen Liganden als monovalente Inhibitoren zeigt sich in der Praxis, dass aufgrund der geringen Bindungsaffinität keine effiziente Inhibition multivalenter Wechselwirkungen erreicht werden kann. Zum Beispiel beträgt die Bindungskonstante bei der Wechselwirkung zwischen einem monovalenten Galaktosid und dem entsprechenden Lectin lediglich $K_D \sim 10^{-4} \text{M}$ (D. T. Connolly et al., J. Biol. Chem., **257**, 939, 1982). Für eine therapeutische Anwendung müssten in einem solchen Fall sehr grosse Mengen Inhibitor eingesetzt werden. Eine Behandlungsmethode mit einem solchen Inhibitor wäre somit nicht wirtschaftlich.


Als multivalente Inhibitoren sind solche, bei denen mehrere Liganden kovalent an einen niedermolekularen Träger (L. L. Kiesling, N. L. Pohl, Chemistry & Biology, **3**, 71, 1996; G. D. Glick, P. L. Toogood, D. C. Wiley, J. J. Skehel, J. R. Knowles, J. Biol. Chem., **266**, 23660, 1991) oder an ein Dendrimer (D. Zanini, R. Roy, J. Org. Chem., **63**, 3486, 1998) gebunden sind, bekannt. In diesen Fällen wird jedoch die spezifische Bindungsaffinität nur geringfügig erhöht.

Ferner sind auch multivalente Inhibitoren bekannt, bei denen die aktiven Liganden an einen polymeren Träger gebunden sind. Diese Verbindungen zeigen im Vergleich zu den entsprechenden monomeren Liganden eine erhöhte Effizienz. Am Beispiel der Wechselwirkung zwischen dem Influenza-Hämagglutinin, das an Neuraminsäure-Derivate an der Zelloberfläche bindet, wurde gezeigt, wie sich die Verwendung eines multivalenten Inhibitors auf Polymer-Basis auf diese Wechselwirkung auswirkt (monovalent: $K_D \sim 2 \times 10^{-4} \text{M}$, multivalent: $K_D \sim 3 \times 10^{-7} \text{M}$; A. Spaltenstein et al., J. Am. Chem. Soc., **113**, 686, 1991).

Trotz der verbesserten Wirksamkeit sind auch die bisher bekannten multivalenten

polymeren Inhibitoren für einen therapeutischen Einsatz nicht geeignet. Die Nachteile sind hierbei auf die verwendeten polymeren Trägermoleküle und auf deren Eigenschaften zurückzuführen.

Bei der Verwendung von Polylysin oder von sulfatierten Polysacchariden als polymere Träger treten unspezifische ionische Wechselwirkungen mit Zelloberflächenstrukturen auf.



Polyacrylamide und andere Polymere, deren Polymeranteil ausschliesslich aus C-C-Bindungen besteht, haben den entscheidenden Nachteil, dass sie im Organismus zu toxischen Metaboliten abgebaut werden.

Hochpolymere (60-70 kDa) werden nicht mehr wirkungsvoll von der Niere filtriert, wobei ihr Abbau durch die Leber durch die Bildung von toxischen Metaboliten zu Unverträglichkeiten führen kann.

In den Patentanmeldungen EP 601417 und WO 95/34673 werden Kohlenhydratrezeptorblocker auf Polymerbasis beschrieben, die als Gesamtmolekül und als Abbauprodukte physiologisch verträglich sind. Diese Eigenschaften werden durch die Verwendung von biodegradablen Polymeren erreicht. Für einen Einsatz als Arzneimittel haben jedoch auch diese Produkte einen grundsätzlichen Nachteil, denn Polymere sind in der Praxis keine reinen und exakt definierten Verbindungen, sondern bestehen vielmehr aus komplexen Gemischen von Verbindungen unterschiedlicher molekularer Grösse. Durch diesen Umstand wird die Anwendung (Zulassung) eines solchen polymeren Inhibitors als Arzneimittel ausserordentlich erschwert.

Wichtig für ein Arzneimittel sind genaue Kenntnisse der Zusammenhänge zwischen der chemischen Struktur eines Wirkstoffs und seinen pharmakologischen Eigenschaften. Im Falle von Substanz-Gemischen müsste gezeigt werden, in welcher Art und Weise die Zusammensetzung eines Gemisches seine jeweiligen

pharmakologischen Eigenschaften beeinflusst. Zudem muss ein Arzneimittel in seiner chemischen Zusammensetzung genau definiert sein und nachweislich in eben dieser hergestellt werden können. Beide Voraussetzung können im Fall der polymeren multivalenten Inhibitoren mit den derzeit verfügbaren synthetischen und analytischen Methoden und unter einem technisch sinnvollen Aufwand nicht erfüllt werden.

Eine weitere Gruppe von multivalenten Inhibitoren bilden Verbindungen bei denen die Liganden an die Oberfläche von Liposomen gebunden sind. Liposome haben den Nachteil, dass ihre lipophilen Bestandteile unspezifische Wechselwirkungen eingehen können, z.B. durch den Einbau in Zellmembranen.

Daher ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden und neue Verbindungen mit verbesserten Eigenschaften als multivalente Inhibitoren biologischer Erkennungsprozesse bereitzustellen, wobei die Verbindungen spezifisch wirken und zur Verwendung als Arzneimittel geeignet sind.

Diese Aufgabe wird gemäß der Ansprüche gelöst mit einer Verbindung der allgemeinen Formel (I)



wobei

X für eine m-wertige Einheit steht und die
B gleich oder verschieden sind und für K-R stehen,

wobei

K für eine zweiwertige Molekülkette, und

R für Wasserstoff, einen zur spezifischen Bindung an einen
Rezeptor geeigneten Liganden, ein Marker-Molekül oder eine
katalytisch aktive Gruppe steht, und

m mindestens 2 ist,
mit der Maßgabe, dass

- (1) in der Verbindung mindestens ein R nicht Wasserstoff ist,
- (2) mindestens zwei K vorliegen,
- (3) X, die B und m so gewählt sind, dass eine intermolekulare Assoziation der K in flüssiger Phase, insbesondere unter wässrigen Bedingungen, unter Ausbildung von Aggregaten, die auf der Oberfläche mehrere R präsentieren, die nicht Wasserstoff sind, möglich ist, und
- (4) die Molmasse des Fragments $X(K)_m$ weniger als 20.000 beträgt.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen sind Gegenstand der Unteransprüche.

In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die Molmasse des Fragments $X(K)_m$ weniger als 10.000, noch bevorzugter weniger als 4.000.

Durch Selbstassoziation von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) entstehen Aggregate, die als hocheffiziente multivalente Inhibitoren biologischer Erkennungsprozesse wirken.

Bei den Verbindungen der Formel (I) sind X, die B und m so gewählt, dass eine intermolekulare Assoziation der K in flüssiger Phase, insbesondere auch unter wässrigen Bedingungen, vorzugsweise unter in vivo Bedingungen, unter Ausbildung von Aggregaten, die auf der Oberfläche mehrere R präsentieren, die nicht Wasserstoff sind, möglich ist.

Es wurde gefunden, dass durch die Ausbildung der erfindungsgemäßen Aggregate die Nachteile der bisher bekannten multivalenten Wirkstoffe vermieden werden können.

Es wurde insbesondere gefunden, dass die geringe Erhöhung der Bindungsaffinität gegenüber einem monovalenten Wirkstoff bei kovalenter Bindung mehrerer Liganden an einen niedermolekularen Träger oder an ein Dendrimer darauf zurückzuführen ist, dass solche Moleküle zwar mehrere Liganden präsentieren, diese aber nicht oder nur

teilweise so angeordnet werden können, dass es zu einer thermodynamisch günstigen Wechselwirkung mit Rezeptoren kommt. Es wurde gefunden, dass die Wechselwirkung eines polyvalenten Wirkstoffs verbessert werden kann, indem die Ligandenanordnung mit der Rezeptorenanordnung dynamisch gekoppelt wird. Es wurde gefunden, dass diese dynamische Kopplung über eine intermolekulare Aggregatbildung erreicht werden kann, bei der sich spezielle Molekülbereiche des Wirkstoffs intermolekular assoziieren und so eine Anpassung der Ligandenanordnung ermöglicht wird. Schließlich wurde gefunden, dass die dadurch ermöglichte Anpassung der Ligandenanordnung zu einer drastischen Erhöhung der Bindungsaffinität des polyvalenten Wirkstoffs führt.

Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung ermöglichen durch die Reversibilität der Aggregatbildung die polyvalente Wechselwirkung einer molekularen Einheit mit mehreren Rezeptoren unter nachträglicher Optimierung der Ligandenanordnung, wobei eine thermodynamisch günstige Anordnung gefunden wird ohne dass es zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie der Einlagerung der Verbindungen in die Zellmembran, kommt.

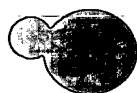
Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind kleine Moleküle für die eine Wirkung als Antigen nicht zu erwarten ist und auch die anderen bei polymeren polyvalenten Wirkstoffen auftretenden Nachteile vermieden werden.

Der molekulare Aufbau der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) ist im wesentlichen gekennzeichnet durch drei Strukturmerkmale:

-
- ein m-wertiges Fragment X,
 - mehrere Molekülketten K, die kovalent an das Fragment X gebunden sind,
 - mindestens eine terminale Gruppe R, die ein zur spezifischen Bindung an einen Rezeptor geeigneter Ligand, ein Marker-Molekül oder eine katalytisch aktive Gruppe ist.

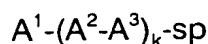
Die Molekülketten K zeichnen sich durch eine chemische Struktur aus, die eine

intermolekulare Assoziation in flüssiger Phase auch unter wässrigen, insbesondere in vivo Bedingungen unter Ausbildung von Aggregaten ermöglicht. Die Ausbildung der Aggregate beruht auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wobei die nicht-kovalenten Wechselwirkungen ionische Wechselwirkungen, van der Waals-Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder bevorzugt Wasserstoffbrückenbindungen sein können. Der Aufbau von nicht-kovalenten Bindungen zwischen mehreren Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bewirkt eine Selbstassoziation und somit die Bildung von Aggregaten.



Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) weisen mindestens eine terminale Gruppe R auf, die beispielsweise von einem biologisch aktiven Liganden oder einem Marker abgeleitet ist. Die terminalen Gruppen R sind kovalent an die terminalen Enden der zur Assoziation dienenden Molekülketten gebunden. Die Bindung dieser Gruppen kann direkt oder über einen Spacer geschehen. Als Spacer kann ein zweiwertiges Molekülfragment dienen, das an der intermolekularen Assoziation durch nicht-kovalente Wechselwirkungen nicht teilnimmt, sondern lediglich dazu dient, die terminalen Gruppen R zu halten. Ein solcher Spacer ist formal Teil der Molekülkette K.

In einer bevorzugten Ausführungsform steht K in der Formel (I) für



wobei

-
- | | |
|-------|------------------------------------------------------------------|
| A^1 | für $(CH_2)_t Y (CH_2)_u$ steht, wobei |
| Y | für $>C=O$, $>NH$, $-O-$, $-S-$ oder eine Bindung, |
| t | für eine ganze Zahl von 0 bis 6 und |
| u | für eine ganze Zahl von 0 bis 6 steht, |
| A^2 | für $-NHCO-$, $-CONH-$, $-OCONH-$ oder $SCONH-$ steht, |
| A^3 | für $(CH_2)_r$, $O(CH_2)_r$, $NH(CH_2)_r$, $S(CH_2)_r$, oder |
| | $-(CHQ)-$ steht, wobei |

- r für eine ganze Zahl von 1 bis 6 und
 Q für eine substituierte oder unsubstituierte Alkyl- oder Aryl-Gruppe steht,
 sp für einen zweiwertigen Spacer oder eine Bindung steht, und
 k für eine ganze Zahl von 5 bis 100 steht.

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wobei

- m für eine ganze Zahl von 2 bis 4 steht, und
 X für CH_{4-m} , NH_{3-m} , N^+H_{4-m} , $>P-$ (wenn $m = 3$), $>P^+<$ (wenn $m = 4$), $>B-$ (wenn $m = 3$), eine lineare Atomgruppe C_2H_{6-m} , $>CH(CH_2)_zCH<$, $>C=C<$, $>N-N<$, $>N(CH_2)_zN<$ wobei $z = 2 - 6$, wenn $m = 4$), eine carbocyclische Atomgruppe C_6H_{6-m} , C_6H_{12-m} , oder eine heterocyclische Atomgruppe C_3N_3 (wenn $m = 3$), C_4N_2 (wenn $m = 4$) steht.

Es ist besonders bevorzugt, dass bei einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) mindestens 3 K vorliegen. Speziell sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bevorzugt, bei denen mindestens zwei, noch bevorzugter drei R nicht Wasserstoff sind.

Wenn mehr als eine terminale Gruppe R in einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) vorliegt, dann können diese Gruppen gleich oder verschieden sein.

Als Beispiele der für die spezifische Bindung an einen Rezeptor geeigneten Liganden, die als terminale Gruppen R der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) fungieren, seien natürlich vorkommende biologische Erkennungsstrukturen wie Mono- oder Oligosaccharide, Peptide, Mono- oder Oligonukleotide oder Nukleinbasen genannt. Es können aber auch synthetische Derivate dieser Verbindungen oder andere organische oder anorganische Verbindungen, die von biologischen Rezeptoren erkannt werden, verwendet werden. Als Liganden können ferner bekannte Verbindungen verwendet werden, die in freier Form als

therapeutische Wirkstoffe zum Einsatz kommen. Beispielhaft seien genannt:

- Antitumormittel, wie z. B. Daunomycin, Doxorubicin, Vinblastin, Bleomycin;
- Antibiotika, wie z. B. Peniciline, Erythromycine, Azidamfenicol, Cephalotin und Griseofulvin;
- Antagonisten der Blutplättchenaktivierungsfaktoren;
- Leukotrien Antagonisten;
- Inhibitoren des Cyclooxygenase-Systems, wie z. B. Salicylsäureverbindungen;
- Lipxygenase-Inhibitoren;
- Antiphlogistika, wie z. B. Indomethacin;
- Antirheumatica, wie z. B. Nifenazon;
- Therapeutische Radionuklide, wie z.B. Wismuth;
- Neuraminidase;
- Inhibitoren, wie z.B. Zanamivir.

Vorzugsweise werden Oligosaccharide verwendet, die auf Zelloberflächen als Bestandteil von Glycoproteinen, Glycolipiden oder Proteoglycanen vorkommen, sowie beliebige Teilstücke daraus.

Spezielle Oligosaccharide, die als terminale Gruppe R verwendet werden können sind wie folgt: Sialinsäure, Sialyllactose, Sialyllactosamin, Lactose, $\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}$, $\text{Gal}\alpha 1\text{-3(Fuca}\alpha 1\text{-2)Gal}$, $\text{GalNAc}\alpha 1\text{-3(Fuca}\alpha 1\text{-2)Gal}$, $\text{Neu5Ac}\alpha 2\text{-6GalNAc}$, SiaLe^A , SiaLe^X , HSO_3Le^A , HSO_3Le^X , $\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$, $\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$, $\text{Neu5Ac}\alpha 2\text{-6Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$.

Die terminalen Gruppen R können auch von Markermolekülen abgeleitet sein. Solche Markermoleküle ermöglichen den Einsatz der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bei diagnostischen Anwendungen. Alle dem Fachmann bekannten Markermoleküle für in vitro diagnostische Testsysteme wie z. B. Biotin, Fluorescein, Rhodamin, Digoxigenin oder radioaktive Marker kommen für die Zwecke der vorliegenden Erfindung in Frage. Insbesondere dem Fachmann bekannte Marker für die in vivo Diagnose, wie radioaktive Marker, die ein gebundenes Radionuklid

enthalten, z. B. Technetium, Röntgenkontrastmittel, die z. B. eine iodierter Verbindung beinhalten, oder Kernresonanzkontrastmittel, z. B. auf Basis von Gadoliniumverbindungen seien erwähnt.

Es wird vorgeschlagen, dass in einer bevorzugten Ausführungsform die terminalen Gruppen R so gewählt werden, dass Aggregate erhalten werden, die einerseits über geeignete Liganden durch polyvalente Wechselwirkungen mit geeigneten Rezeptoren wechselwirken und andererseits Markereinheiten enthalten. Dadurch werden die polyvalenten Wechselwirkungen einer Detektion zugänglich und die Verbindungen können in einem diagnostischen Verfahren eingesetzt werden.

Die Aggregate können in diesem Fall aus Verbindungen der Formel (I) aufgebaut sein, die sowohl Liganden- als auch die Markerreste enthalten. Vorzugsweise umfasst ein solches Aggregat nur eine spezielle Verbindung der allgemeinen Formel (I). Andererseits kann ein Aggregat aber auch mehrere verschiedene Verbindungen der Formel (I) umfassen, wobei die Verbindungen entweder Liganden oder Markerreste enthalten.

Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein Aggregat der folgenden allgemeinen Formel (II) bereit,



wobei die

$X(B)_m$ gleich oder verschieden sein können und für eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert ist, stehen, und


n für 2 bis 100.000 steht,

und wobei die $X(B)_m$ nicht-kovalent gebunden sind.

Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung ein Aggregat mit linearer, zyklischer,

polyzyklischer, polyedrischer, kugelförmiger oder dendritischer Struktur bereit. Die Aggregate können aus zwei oder mehreren verschiedenen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bestehen.

Die vorliegende Erfindung stellt auch Verbindungen der allgemeinen Formel (III) bereit. Die Verbindungen der allgemeinen Formel (III) entsprechen denjenigen der Formel (II), wobei alle terminalen Gruppen R für ein Wasserstoffatom stehen. Diese Verbindungen können mit den oben beschriebenen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) eingesetzt werden, um die Eigenschaften der Aggregate zu verändern.

 Speziell stellt die vorliegende Erfindung eine Verbindung der allgemeinen Formel (III) bereit,



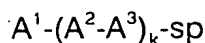
wobei

X für eine m-wertige Einheit steht und die
B gleich oder verschieden sind und für K-H stehen,
wobei

K für eine zweiwertige Molekülkette, und
m mindestens 2, ist,
mit der Maßgabe, dass

- (1) X, die B und m so gewählt sind, dass eine intermolekulare Assoziation der K in flüssiger Phase, insbesondere unter wässrigen Bedingungen, unter Ausbildung von Aggregaten, möglich ist, und
- (2) die Molmasse des Fragments $X(K)_m$ weniger als 20.000, insbesondere weniger als 4000, beträgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform steht K in der Formel (III) für



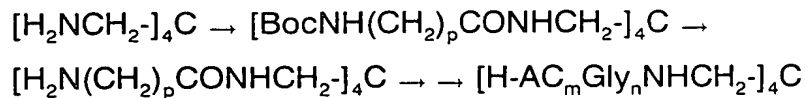
wobei

- A^1 für $(CH_2)_t Y (CH_2)_u$ steht, wobei
Y für $>C=O$, $>NH$, $-O-$, $-S-$ oder eine Bindung,
t für eine ganze Zahl von 0 bis 6 und
u für eine ganze Zahl von 0 bis 6 steht,
 A^2 für $-NHCO-$, $-CONH-$, $-OCONH-$ oder $SCONH-$ steht,
 A^3 für $(CH_2)_r$, $O(CH_2)_r$, $NH(CH_2)_r$, $S(CH_2)_r$, oder
 $-(CHQ)-$ steht, wobei
r für eine ganze Zahl von 1 bis 6 und
Q für eine substituierte oder unsubstituierte Alkyl- oder Aryl-
Gruppe steht,
sp für einen zweiwertigen Spacer oder eine Bindung steht, und
k für eine ganze Zahl von 5 bis 100 steht.

Jetzt wird die Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) beschrieben. Entsprechend dieser Herstellungsweise können auch die Verbindungen der Formel (III) hergestellt werden.

Die Synthese der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) wird vorteilhafterweise jeweils ausgehend von den entsprechenden Tetraminen durch sukzessive Kettenverlängerung durchgeführt (Schema 1). Hierbei werden bekannte Methoden aus der Peptid-Chemie angewendet, wobei als N-Schutzgruppe die Boc-Gruppe verwendet wird. Die Amidbindungen werden vorzugsweise mit der Aktiv-Ester-Methode gebildet.

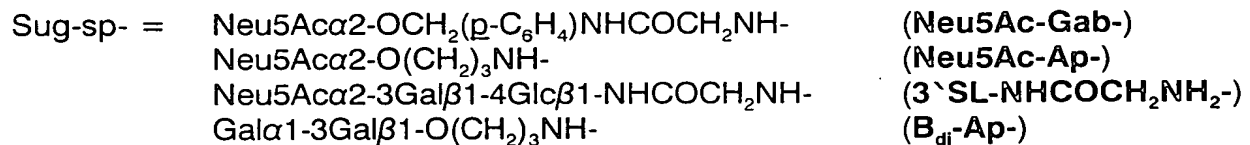
Schema 1



$n = 0$ bis 7, $m = 0$ bis 3

Die terminalen Gruppen werden vorteilhafterweise ebenfalls über die Aktiv-Ester-Methode an die gemäss Schema 1 synthetisierten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) geknüpft (Schema 2).

Schema 2



Jetzt wird die Bildung der Aggregate in Einzelheiten und anhand der Figuren beschrieben. Es zeigen

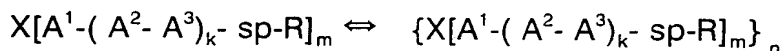
Fig. 1 Elutionsprofile der Aggregate $\{[Neu5Ac-Gab-AC_n-Ad-Gly_5-NHCH_2-]_4C\}_x$, HPLC, TSK-4000, 0.2M NaCl;

Fig. 2 die relative Partikelgrössenverteilung des Aggregats $\{[Neu5Ac-Gab-Ad-AC_3-Gly_5-NHCH_2-]_4C\}_x$, 20°C H₂O;

Fig. 3 den Einfluss der Temperatur und der Anwesenheit von Harnstoff auf die Partikelgrösse des Aggregats $\{[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly_7-NHCH_2-]_4C\}_x$

Die Aggregate sind hochmolekulare nicht-kovalente Polymere, die durch Selbstassoziation von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) entstehen (Schema 3).

Schema 3



Diese intermolekulare Assoziation verläuft spontan und führt zur Bildung von stabilen und geordneten Strukturen. Der Verlauf dieses Prozesses hängt von der molekularen Struktur der eingesetzten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und von den äusseren Bedingungen ab. Die Molmassen, Grössen und Formen der hierbei gebildeten Aggregate werden ebenfalls von diesen Faktoren bestimmt.

Die nicht-kovalente Natur der Bindungen zwischen den Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bedingt die Reversibilität der Aggregatbildung und ermöglicht bei einer Veränderung der äusseren Bedingungen eine Dissoziation der Aggregate zu Verbindungen der allgemeinen Formel (I) oder ihre Umwandlung in andere Aggregate, jeweils im Sinne der Bildung der thermodynamisch stabilsten Strukturen.

Die Selbstassoziation von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zu Aggregaten kann sowohl in Lösungen als auch auf Oberflächen beobachtet werden.

Mittels Raster-Tunnel-Mikroskopie (STM) und Atomkraft-Mikroskopie wurde gezeigt, dass das Aggregat $\{[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly_3-NHCH_2]_4C\}$ auf einer Graphit-Unterlage geordnete Kettenstrukturen ausbildet.

Die Bildung von Aggregaten in Lösungen kann durch Lichtstreuungs-Experimente oder Gelpermeations-Chromatographie beobachtet werden.

Die Verbindung der allgemeinen Formel (I) $Neu5Ac-Gab-AC_n-Ad-Gly_5-NHCH_2]_4C$ ($n=1-3$) assoziiert bei Raumtemperatur in wässrigen und organischen Lösungsmitteln. Die Untersuchung der in Wasser gebildeten Assoziate mittels Gelpermeations-Chromatographie zeigte die Bildung von Aggregaten mit Molekulargewichten von ca.

2000 kD, wie es in Figur 1 gezeigt wird.

Die Untersuchung der Assoziation der Verbindung der allgemeinen Formel (I) [Neu5Ac-Gab-Ad-AC₃-Gly₅-NHCH₂]₄C (**44**) in Wasser bei 20°C zeigte die Bildung von drei Typen von Aggregaten mit Partikelgrößen zwischen 25 und 2000nm (Figur 2). Beim Erwärmen der Probe auf 60°C wurde eine Abnahme des relativen Anteils der kleineren Partikel beobachtet, wobei gleichzeitig der relative Anteil der grösseren Partikel zunahm und die Gesamtanzahl der Teilchen abnahm. Eine Zunahme der Aggregat-Grösse mit der Temperatur wurde auch bei der Verbindung der allgemeinen Formel (I) (**48**) beobachtet. Diese Verbindung bildet in Wasser bei 60°C Teilchen mit Größen bis zu 8000nm (Figur 3).

Zu den äusseren Bedingungen, die die Bildung der Aggregate und den Verlauf der intermolekularen Assoziation bestimmen, zählen neben der Temperatur, der pH-Wert und die Art und Zusammensetzung des Lösungsmittels. Durch Lichtstreuungs-Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Verbindung [Gly₇-NHCH₂]₄C (**22a**) in Wasser bei 20°C in nicht-assoziiierter Form vorliegt, jedoch durch Zugabe einer 0.8 M NaHCO₃-Lösung eine Selbstassoziation der Verbindung erreicht wird. Durch Zugabe von HCl kann dann anschließend die Assoziation wieder rückgängig gemacht werden (vgl. Beispiel 9).

Die Bildung von Aggregaten wird auch durch die Anwesenheit von Komponenten beeinflusst, welche mit den Verbindungen der allgemeinen Formel (I) Wechselwirkungen eingehen können. Dies können organische Moleküle sein, wie z.

B. Verbindungen der Formel (III), Harnstoff (Abbildung 3), Trifluorethanol, Methanol, Aceton oder andere organische Lösungsmittel. Es können auch andere Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bzw. (III) sein, die für sich alleine - unter den gegebenen Bedingungen - keine Assoziante ausbilden.

Bei Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und Aggregaten wird der Prozess der Selbstassoziation auch durch die Wechselwirkungen zwischen den Liganden und

den entsprechenden Rezeptoren beeinflusst. Dieser Einfluss kann z. B. darin bestehen, dass erst durch die Anwesenheit der Rezeptoren eine Assoziation von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) hervorgerufen wird, und zwar unter Bedingungen bei denen sonst keine Assoziation dieser Verbindungen stattfinden würde. Durch die Reversibilität der Aggregatbildung ist es ebenso möglich, dass sich Aggregate in Anwesenheit von Rezeptoren unter Umlagerung oder Veränderung der Zusammensetzung so verändern, dass ein thermodynamisch günstiger Zustand des Gesamtsystems aus Aggregat und Rezeptor erreicht wird. Die Aggregate können sich daher an unterschiedliche Rezeptoranordnungen anpassen und so eine Wechselwirkung zwischen den Rezeptoren und Liganden optimieren. Diese Optimierung durch nachträgliche Anpassung der polyvalenten Wechselwirkungen stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber dem Stand der Technik dar.

Jetzt werden spezielle biologisch aktive Aggregate beschrieben. Durch die Selbstassoziation von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) mit biologisch aktiven Liganden entstehen biologisch aktive Aggregate, die als hocheffektive multivalente Inhibitoren von biologischen Erkennungsprozesse wirken. Die spezifische Aktivität eines solchen Inhibitors ist abhängig von der Affinität der terminalen Gruppen R, aber auch von der "Matrix" des Aggregats, d. h. der Struktur der als Träger verwendeten Verbindung der allgemeinen Formel (I).

Die Tabellen 2 und 3 zeigen den Einfluss der Matrix-Struktur auf die Inhibition der viralen Zelladhäsion von Influenza-Viren, gemessen in einem dem Fachmann bekannten Fetuin-Binding Assay. Dabei wird die Verstärkung der spezifischen Aktivität des Inhibitors um mehr als drei Größenordnungen gegenüber der Aktivität des freien Liganden Neu5Ac α Bn im Falle des Aggregats {[Neu5Ac-Gab-Ad-AC₃-Gly₅-NHCH₂-]₄C}_x (44) deutlich.

Tabelle 1

Inhibition der viralen Zelladhäsion von Influenza Viren, Stamm
A/NIB/44/90M H3N2, FBI-test, Neu5AcαBn als a Referenz-Verbindung,
spezifische Aktivität pro Neu5Ac-Gruppe

Inhibitor	Relative Aktivität
Neu5Acα-OBn	1
[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly _n -NHCH ₂] ₄ C (n=0-5)	2
[Neu5Ac-Ap-Ad-Gly _n -NHCH ₂] ₄ C (n=3-5)	1
[Neu5Ac-Gab-Ad-GlyGluGly-NHCH ₂] ₄ C	5
[Neu5Ac-Gab-AC-Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	15
[Neu5Ac-Gab-AC ₂ -Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	330
[Neu5Ac-Gab-AC ₃ -Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	1000
[Neu5Ac-Gab-Ad-AC ₂ -Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	1000
[Neu5Ac-Gab-Ad-AC ₃ -Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	2500

Tabelle 2

Inhibition der viralen Zelladhäsion von Influenza Viren Inhibition of Stamm
A/Duck/Alberta/60/67 H12N5, FBI-test, 3`SL als a Referenz-Verbindung,
spezifische Aktivität pro 3`SL-Gruppe

Inhibitor	Relative Aktivität
3`SL	1
[3`SL-NHCOCH ₂ NH-Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	20
[3`SL-NHCOCH ₂ NH-Ad-Gly ₇ -NHCH ₂] ₄ C	200

Ein weiteres Beispiel für die Erhöhung der biologischen Aktivität eines biologischen Liganden durch seine Bindung an ein Aggregat ist die Verbindung $\{[B_{41}-Ap-Ad-AC_2-Gly_5-NHCH_2]_4C\}_x$ (49) als Inhibitor der Zytotoxizität von menschlichen Blutseren gegenüber der Schweinenieren-Nieren-Zellen PK15. Das Aggregat (49) zeigt eine um drei Grössenordnung höhere spezifische Aktivität als der freie Ligand Galα1-3Gal (B-disaccharid).

Verwendete Abkürzungen:

Np para-Nitrophenyl
NOS N-Oxysuccinimidyl
Boc tert-Butyloxycarbonyl

AC	6-Aminocaproyl
Ad	1,6-Hexandioyl
Ap	3-Aminopropyl
Gab	4-(Glycylamido)-benzyl
Sug	Kohlenhydratrest
SL	Sialyllactose
Bn	Benzyl
LC	Säulenchromatographie
DC	Dünnschichtchromatographie

Jetzt wird die Erfindung anhand von Beispielen in weiteren Einzelheiten beschrieben.

Materialien und Methoden:

^1H -NMR Spektren (δ , ppm, TMS) wurden mit einem Spektrometer des Typs WM-500 der Firma Bruker (USA) bei 303°K aufgenommen.

Massenspektren wurden mit einem Flugzeit-Spektrometer des Typs MSBCh (Sumy, Ukraine) aufgenommen (Ionisation durch Spaltprodukte von Californium-252 bei einer Beschleunigungsspannung von +15 eV)

Die Lichtstreuungs-Experimente wurden mit folgenden Geräten durchgeführt:

Coultronics Coulter N4-MD (He-Ne Laser, $\lambda=632.8$ nm, Messung der Streuung bei einem Winkel von 62.5° zum eintretenden Lichtstrahl), Spectra-Physics 164 (Argon Laser, $\lambda=528.7$ nm und $\lambda=611.5$ nm, Messung der Streuung bei einem Winkel von 90° zum eintretenden Lichtstrahl).

Kieselgel 60 (40-63 μm) (Merck) wurde für Säulenchromatographie verwendet. Sephadex der Typen LH-20, G-10, G-25 (Pharmacia, Schweden) und TSK-4000 (HPLC) wurden für Gelpermeations-Chromatographie gebraucht.

Für DC wurden Kieselgel 60 (Merck) und Kieselgel 60 Glassplatten mit Fluoreszenz-

Indikator F254 (Merck) verwendet. Zur Detektion der Flecken auf den DC-Platten wurden folgende Methoden verwendet:

- Erwärmen nach Besprühen mit einer 7%igen H_3PO_4 -Lösung (Kohlenhydratverbindungen);
- Erwärmen nach Besprühen mit einer 2%igen Ninhydrin-Lösung in Ethanol (Verbindungen mit primären Aminogruppen);
- Erwärmen nach einer Verweilzeit von 10 Minuten in einer Kammer über konz. HCl und anschließenden Besprühen mit einer 2%igen Ninhydrin-Lösung in Ethanol (Verbindungen mit Boc-geschützten Aminogruppen);
- Verweilzeit von 10 Minuten in einer Kammer über konz. NH_3 (4-Nitrophenylester);
- Betrachten der Platten unter UV.

Für DC wurden folgende Eluenten-Systeme verwendet:

A – Toluol/Ethylacetat 2:1

B – Aceton/Ethylacetat/Methanol 10:4:1

C – CHCl_3 /MeOH 7:1

D – CHCl_3 /Ethylacetat/MeOH/AcOH 9:3:2:0,2

E – iPrOH/Ethylacetat/ H_2O 2:3:1

F – EtOH/ NH_3 (aq) 2:1

G – iPrOH/Ethylacetat/ H_2O 4:3:2

H – iPrOH/Aceton/ H_2O 4:3:2

Herstellung bekannter Ausgangsverbindungen

Tetrakis-(aminomethyl)-methan-tetrahydrochlorid (1)

wurde analog der Literatur hergestellt (E. B. Fleischer, A.E. Gebala, A. Levey, P.A. Tasker, *J.Org.Chem.*, **36**, 3042, 1971).

DC: $R_f=0,6$; Eluent – 25% Ammoniak/Wasser; Entwickler – Ninhydrin.

Schmp. $>300^\circ\text{C}$.

^1H NMR-Spektrum in D_2O (δ , ppm): 3,45 (s, CH_2).

4-Nitrophenyl-trifluoracetat (2)

wurde analog der Literatur hergestellt (S. Sakakibara, N. Inukai, *Bull.Chem.Soc.Jap.*, **37**, 1231, 1964).

Di-(4-Nitrophenyl)-adipat (3)

wurde analog der Literatur hergestellt (S. Sakakibara, N. Inukai, *Bull.Chem.Soc.Jap.*, **37**, 1231, 1964).

$R_f=0,76$, Eluent D A .

^1H NMR-Spektrum in CDCl_3 (δ , ppm): 1,871 (m, 4H, 2 COCH_2CH_2), 2,666 (m, 4H, 2 COCH_2), 7,255 und 8,240 (m, 8H, $J_{2,3}$ 9Hz, Ar).

Methyl [4-(tert-butyloxycarbonyl-glycylamido)benzyl 5-acetamido-4,7,8,8-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galakto-nonulopyranosid]oat

Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-Boc (4)

wurde analog der Literatur hergestellt (US Patent 5,571,836, 1996).

^1H NMR-Spektrum (CDCl_3 , δ , ppm): 1,448 (s, 9H, CMe_3), 1,849, 1,994, 2,008, 2,111, 2,127 (s, 5x3H, 5 Ac), 1,979 (dd, 1H, H-3_{ax} Neu5Ac), 2,613 (dd, 1H, J_4 4,6 Hz, J_{3ax} 12,9 Hz, H-3_{eq} Neu5Ac), 3,637 (s, 3H, COOCH_3), 3,882 (d, 2H, J 6 Hz, COCH_2NH), 4,058 (ddd, 1H, H-5 Neu5Ac), 4,074 (dd, 1H, J_{9b} 12,5 Hz, J_8 5,9 Hz, H-9a Neu5Ac), 4,112 (dd, 1H, J_5 10,6, J_7 2,3 Hz, H-6 Neu5Ac), 4,299 (dd, 1H, J_{9b} 12,5 Hz, J_8 2,7 Hz, H-9b Neu5Ac), 4,366 und 4,735 (d, 2x1H, J 12 Hz, OCH_2Ar), 4,847 (ddd, 1H, J_5 10 Hz, J_{3ax} 12,3 Hz, J_{3eq} 4,6 Hz, H-4 Neu5Ac), 5,24 (verb., 1H, NHBoc), 5,251 (d, 1H, J_5 9,8 Hz, NH), 5,314 (dd, 1H, J_6 2,3 Hz, J_8 8,2 Hz, H-7 Neu5Ac), 5,424 (ddd, 1H, H-8 Neu5Ac), 7,258 und 7,445 (d, 2x2H, J 8,4 Hz, Ar), 8,144 (verb. s, 1H, NHAr).

Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -NHCOCH₂NH₂ (12)

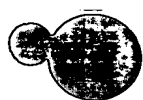
wurde analog der Literatur hergestellt (L.M. Likhoshesterov, O.S. Novikova, V.A. Derevitskaja, N.K. Kochetkov, *Carbohydrate Research*, **146**, C1-C5, 1986; und I.D. Manger, T.W. Rademacher, R.A. Dwek, *Biochemistry*, **31**, 10724, 1992).

^1H -NMR Spektrum (D_2O , δ , ppm): 1,82 (dd, 1H, H-3_{ax} Neu5Ac, J_4 12 Hz), 2,06 (s, 3H, NAc), 2,79 (dd, 1H, H-3_{eq} Neu5Ac, J_{3ax} 12,4 Hz, J_4 4,6 Hz), 3,48 (m, 1H, H-2 Glc, J_3 9 Hz), 3,61 (dd, 1H, H-2 Gal), 3,99 (dd, 1H, H-4 Gal), 4,14 (dd, 1H, H-3 Gal, J_2 9,8 Hz, J_4 3,1 Hz), 4,57 (d, 1H, H-1 Gal, J_2 7,8 Hz), 5,09 (d, 1H, H-1 Glc, J_2 9,3 Hz).

Gal α 1-3Gal β -O(CH $_2$) $_3$ NH $_2$ (13)

wurde analog der Literatur hergestellt (E. Yu. Korchagina, N. V. Bovin, *Bioorganicheskaya Khimiya*, 1992, **18**, 283, Rus).

Die Verbindungen *BocGlyNOS*, *BocGlyGlyNOS* und *BocAC-ONp* wurde unter Verwendung von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid analog der Literatur hergestellt (G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan, *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1839, 1964; M. Bodanszky, V. du Vigneaud, *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 5688, 1959).



Beispiel 1.

Herstellung von Ac $_4$ (OMe)Neu5Ac-Gab-AC-Boc (5).

Zu 0,5mM der Verbindung (4) wurden 10ml CHCl $_3$ und 2ml CF $_3$ COOH zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, mit 2ml Toluol versetzt, im Vakuum eingedampft und getrocknet. Der Rückstand wurde in 10ml CHCl $_3$ gelöst und mit 1,5mM 6-N-Boc-Amino-(4-nitrophenyl)-hexanoat und 0,3ml NEt $_3$ versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und im Vakuum eingedampft. Der erhaltene Rückstand wurde über Kieselgel chromatographiert.



Die Verbindungen Ac $_4$ (OMe)Neu5Ac-Gab-AC $_2$ -Boc (6) und Ac $_4$ (OMe)Neu5Ac-Gab-AC $_3$ -Boc (7) wurden auf analoge Weise hergestellt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 3 (Beispiel 1)

Produkt	Ausgangs- verbindung	DC: Eluent A, R $_f$	Säulenchromatographie	Ausbeute, %
Ac $_4$ (OMe)Neu5Ac-Gab-AC-Boc (5)	(4)	0.6	CHCl $_3$ /MeOH 35:1 \rightarrow 10:1	90
Ac $_4$ (OMe)Neu5Ac-Gab-AC $_2$ -Boc (6)	(5)	0.45	Aceton/Ethylacetat/MeOH 10:4:0.5 \rightarrow 10:4:3	72
Ac $_4$ (OMe)Neu5Ac-Gab-AC $_3$ -Boc (7)	(6)	0.25	Aceton/Ethylacetat/MeOH 10:4:1 \rightarrow 10:4:5	70

^1H NMR-Spektren (CDCl_3 , δ , ppm):

$\text{Ac}_4(\text{OMe})\text{Neu5Ac-Gab-AC-Boc}$ (5): 1,331, 1,468, 1,655 (m, 3CH_2), 1,402 (s, 9H, CMe_3), 2,264 (t, 2H, J 7,5 Hz, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CO}$), 3,066 (m ~ quadr, 2H, J 6,6 Hz, CH_2NHBoc), 4,060 (d, 2H, J 5 Hz, COCH_2NH), 4,364 und 4,733 (d, $2\times 1\text{H}$, J 12 Hz, OCH_2Ar), 4,571 (verb., 1H, NHBoc), 6,521 (verb., 1H, COCH_2NHCO), 7,253 und 7,460 (d, $2\times 2\text{H}$, J 8,4 Hz, Ar), 8,547 (verb. s, 1H, NHAr).

Neu5Ac α -Fragment: (s. (4)).

$\text{Ac}_4(\text{OMe})\text{Neu5Ac-Gab-AC}_2\text{-Boc}$ (6): 1,280, 1,338, 1,447, 1,482, 1,582, 1,655, 2,107 (m, 7CH_2), 1,403 (s, 9H, CMe_3), 2,276 (t, 2H, J 7,2 Hz, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CO}$), 3,060 (m ~ quadr, 2H, J 6,6 Hz, CH_2NHBoc), 3,216 (m ~ quadr, 2H, J 6,4 Hz, CH_2NH), 4,040 (d, 2H, J 5 Hz, COCH_2NH), 4,353 und 4,728 (d, $2\times 1\text{H}$, J 12 Hz, OCH_2Ar), 4,651 (verb., 1H, NHBoc), 5,793 (t, 1H, J 5 Hz, CH_2NHCO), 6,714 (verb., 1H, COCH_2NHCO), 7,245 und 7,467 (d, $2\times 2\text{H}$, J 8,4 Hz, Ar), 8,666 (verb. s, 1H, NHAr).

Neu5Ac α -Fragment: (s. (4)).

$\text{Ac}_4(\text{OMe})\text{Neu5Ac-Gab-AC}_3\text{-Boc}$ (7): 1,283, 1,336, 1,447, 1,482, 1,594, 1,655, 2,117 (m, 11CH_2), 1,401 (s, 9H, CMe_3), 2,282 (t, 2H, J 7,2 Hz, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CO}$), 3,045 (m ~ quadr, 2H, J 6,6 Hz, CH_2NHBoc), 3,214 (m ~ quadr, 4H, J 6,4 Hz, CH_2NH), 4,040 (d, 2H, J 5 Hz, COCH_2NH), 4,353 und 4,728 (d, $2\times 1\text{H}$, J 12 Hz, OCH_2Ar), 4,669 (verb., 1H, NHBoc), 5,876 (t, 1H, J 5,5 Hz, CH_2NHCO), 6,071 (verb., 1H, CH_2NHCO), 6,940 (verb., 1H, COCH_2NHCO), 7,242 und 7,483 (d, $2\times 2\text{H}$, J 8,4 Hz, Ar), 9,033 (verb. s, 1H, NHAr). Neu5Ac α -Fragment: (s. (4)).

Beispiel 2.

Herstellung von **$\text{Ac}_4(\text{OMe})\text{Neu5Ac-Gab-AC-Ad-ONp}$ (9).**

Zu 0,5mM der Verbindung (5) wurden 10ml CHCl_3 und 2ml CF_3COOH zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, mit 5ml Toluol versetzt, im Vakuum eingedampft und getrocknet. Der Rückstand wurde in 15ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 5mM der Verbindung (3) und 0,3 ml NEt_3 versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das überschüssige NEt_3 wurde mit CH_3COOH neutralisiert, und das Reaktionsgemisch eingedampft. Der Rückstand wurde in CHCl_3 gelöst, die erhaltene Lösung wurde mit Wasser gewaschen und eingedampft. Das erhaltene Gemisch wurde über eine Kieselgelsäule chromatographiert (siehe Tabelle 4).

Die Verbindungen **$\text{Ac}_4(\text{OMe})\text{Neu5Ac-Gab-Ad-ONp}$ (8), **$\text{Ac}_4(\text{OMe})\text{Neu5Ac-Gab-AC}_2\text{-$****

Ad-ONp (10) and **Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-AC₃-Ad-ONp (11)** wurden auf analoge Weise hergestellt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4 (Beispiel 2)

Produkt	Ausgangs- verbindung	DC: Eluent C, R _f	Säulenchromatographie	Ausbeut e %
Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-ONp (8)	(4)	0,6	CHCl ₃ /i-PrOH 20:1	78
Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-AC-Ad-ONp (9)	(5)	0,55	CHCl ₃ /MeOH/AcOH 35:1:0,2 → 15:1:0,2	65
Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-AC₂-Ad-ONp (10)	(6)	0,48	CHCl ₃ /MeOH/AcOH 35:1:0,2 → 15:1:0,2	60
Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-AC₃-Ad-ONp (11)	(7)	0,43	CHCl ₃ /MeOH/AcOH 35:1:0,2 → 15:1:0,2	62

¹H NMR-Spektren:

Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-ONp (8) (CDCl₃, δ, ppm): 1,774 (m, 2H, CH₂CH₂COO), 1,843, 1,984, 2,00, 2,100, 2,117 (s, 5x3H, 5 Ac), 1,966 (dd, 1H, H-3_{ax} Neu5Ac), 2,335 und 2,393 (m, 2x1H, CH₂CH₂CONH), 2,601 (t, 2H, J 6Hz, CH₂CH₂COO), 2,604 (dd, 1H, H-3_{eq} Neu5Ac), 3,645 (s, 3H, COOCH₃), 3,688 (t, 2H, J 4,7Hz, CH₂CH₂CONH), 4,049 (ddd, 1H, H-5 Neu5Ac), 4,062 (dd, 1H, J₈ 6_HHz, H-9a Neu5Ac), 4,074 (d, 2H, J_{NH} 5,5Hz, COCH₂NHCO), 4,111 (dd, 1H, J₅ 10,7, J₇ 2,3Hz, H-6 Neu5Ac), 4,298 (dd, 1H, J_{9b} 12,5Hz, J₈ 2,9Hz, H-9b Neu5Ac), 4,343 und 4,722 (d, 2x1H, J 12Hz, OCH₂Ar), 4,839 (ddd, 1H, J₅ 10,2Hz, J_{3ax} 12,3Hz, J_{3eq} 4,6Hz, H-4 Neu5Ac), 5,307 (dd, 1H, J₈ 8,4Hz, J₆ 2,3Hz, H-7 Neu5Ac), 5,359 (d, 1H, J₅ 9,7Hz, NH), 5,406 (ddd, 1H, H-8 Neu5Ac), 6,616 (t, 1H, COCH₂NHCO), 7,243 und 7,450 (d, 2x2H, J 8,5Hz, p-C₆H₄NH), 7,221 und 8,208 (d, 2x2H, J 9Hz, p-C₆H₄NO₂), 8,586 (s, 1H, NHAr).

Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-AC-Ad-ONp (9) (CDCl₃, δ, ppm): 1,341 (m, 2H, COCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1,495 und 1,666 (m, 2x2H, COCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1,729 (m, 2H, CH₂CH₂COO), 1,856, 1,991, 2,010, 2,110 und 2,129 (s, 5x3H, 5 Ac), 1,976 (dd, 1H, H-3_{ax} Neu5Ac), 2,138, 2,175 (m, 2x1H, CH₂CH₂CONH), 2,182 und 2,267 (t, 2x2H, 2 CH₂CONH), 2,601 (~t, 2H, J 6,8Hz, CH₂CH₂COO), 2,611 (dd, 1H, J_{3ax} 12,8, J₄ 4,5Hz, H-3_{eq} Neu5Ac), 3,228 (m ~ quadr, 2H, J 6,6Hz, CH₂NHCO), 3,645 (s, 3H, COOCH₃), 4,022 (d, 2H, J_{NH} 5,4Hz, COCH₂NHCO), 4,050 (ddd, 1H, H-5 Neu5Ac), 4,065 (dd, 1H, J₈ 6Hz, H-9a Neu5Ac), 4,113 (dd, 1H, J₅ 10,8, J₇ 2,3Hz, H-6 Neu5Ac), 4,295 (dd, 1H, J_{9a} 12,5Hz, J₈ 2,9Hz, H-9b Neu5Ac), 4,357 und 4,732 (d, 2x1H, J 12Hz, OCH₂Ar), 4,848 (ddd, 1H, J₅ 10Hz, J_{3ax} 12,2Hz, J_{3eq} 4,5Hz, H-4 Neu5Ac), 5,170 (d, 1H, J₅ 10Hz, NH), 5,308 (dd, 1H, J₈ 8,6Hz, J₆ 2,3Hz, H-7 Neu5Ac), 5,413 (ddd, 1H, H-8 Neu5Ac), 5,708 (t, 1H, CH₂CH₂NHCO), 6,483 (t, 1H, COCH₂NHCO), 7,251 und 7,427 (d, 2x2H, J 8,7Hz, p-C₆H₄NH), 7,243 und 8,224 (d, 2x2H, J 9Hz, p-C₆H₄NO₂), 8,298 (s, 1H, NHAr).

Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-AC₂-Ad-ONp (10) (D₅-DMSO, δ, ppm): 1,231, 1,376, 1,485 und 1,608 (m,

CH₂), 1,757 (dd, 1H, H-3_{ax} Neu5Ac), 1,678, 1,917, 1,974, 2,023 und 2,092 (s, 5x3H, 5 Ac), 2,570 (dd, 1H, J_{3ax} 12,4, J₄ 4,5Hz, H-3_{eq} Neu5Ac), 2,638 (t, 2H, J 7Hz, CH₂CH₂COO), 3,009 (m, 4H, 2CH₂NHCO), 3,699 (s, 3H, COOCH₃), 3,859 (d, 2H, J_{NH} 5,9Hz, COCH₂NHCO), 3,904 (ddd, 1H, H-5 Neu5Ac), 4,027 (dd, 1H, J₈ 6,2Hz, H-9a Neu5Ac), 4,089 (dd, 1H, J₅ 10,8, J₇ 2,6Hz, H-6 Neu5Ac), 4,235 (dd, 1H, J_{9a} 12,4Hz, J₈ 3,1Hz, H-9b Neu5Ac), 4,322 und 4,645 (d, 2x1H, J 11,7Hz, OCH₂Ar), 4,715 (ddd, 1H, J₅ 10Hz, J_{3ax} 12Hz, J_{3eq} 4,5Hz, H-4 Neu5Ac), 5,193 (dd, 1H, J₈ 8,4Hz, J₆ 2,Hz, H-7 Neu5Ac), 5,341 (ddd, 1H, H-8 Neu5Ac), 7,216 und 7,554 (d, 2x2H, J 8,4Hz, *p*-C₆H₄NH), 7,433 und 8,296 (d, 2x2H, J 9,2Hz, *p*-C₆H₄NO₂), 7,674 (t, 1H, J 5,5Hz, CH₂CH₂NHCO), 7,706 (d, 1H, J₅ 9,8Hz, NH), 7,754 (t, 1H, J 5,8Hz, CH₂CH₂NHCO), 8,081 (t, 1H, J 5,9Hz, COCH₂NHCO), 9,961 (s, 1H, NHAr).

Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-AC₃-Ad-ONp (11) (D₆-DMSO, δ, ppm): 1,214, 1,360, 1,478, 1,609 (m, CH₂), 2,639 (t, 2H, J 7Hz, CH₂CH₂COO), 2,999 (m, 6H, 3CH₂NHCO), 3,864 (d, 2H, J_{NH} 5,9Hz, COCH₂NHCO), 4,324 und 4,645 (d, 2x1H, J 11,7Hz, OCH₂Ar), 7,212 und 7,568 (d, 2x2H, J 8,4Hz, *p*-C₆H₄NH), 7,435 und 8,295 (d, 2x2H, J 9,2Hz, *p*-C₆H₄NO₂), 7,700 (m, 2H, 2CH₂CH₂NHCO), 7,750 (t, 1H, J 5,8Hz, CH₂CH₂NHCO), 8,122 (t, 1H, J 5,9Hz, COCH₂NHCO), 10,047 (s, 1H, NHAr), Neu5Acα-Fragment: s. (10).

Beispiel 3.

Herstellung von

Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-NHCOCH₂NHCO(CH₂)₄COO(4-C₆H₄NO₂) (14).

119mg (0,172mM) der Verbindung (12) in 0,5ml DMSO wurde unter Rührung zu einer Lösung von 334mg (0,86mM) der Verbindung (3) in 2ml DMF zugegeben. Das Gemisch wurde 24 Stunden bei 20°C gerührt. Nach Zugabe von 200μl AcOH wurde das Reaktionsgemisch mit 15ml Wasser verdünnt. Die Lösung wurde filtriert und das Filtrat wurde auf ein Volumen von ~2ml eingedampft. Der Rückstand wurde auf eine Sephadex LH-20 Säule (1,5x50cm) gegeben und mit MeCN/H₂O (1:1, 0,2% AcOH) eluiert. Nach Isolation wurden 140mg (14) erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 87%. DC: R_f 0,41 (Eluent H).

¹H-NMR Spektrum (D₂O, δ, ppm): 1,737 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CO), 1,779 (dd, 1H, H-3_{ax} Neu5Ac, J₄ 12,5 Hz), 2,003 (s, 3H, NAc), 2,383 (t, 1H, J 7 Hz, CH₂CO), 2,733 (dd, 1H, H-3_{eq} Neu5Ac, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,5 Hz), 3,432 (m, 1H, H-2 Glc, J₃ 9 Hz), 3,556 (dd, 1H, H-2 Gal), 3,933 (dd, 1H, H-4 Gal),

4,090 (dd, 1H, H-3 Gal, J_2 10 Hz, J_4 3 Hz), 4,499 (d, 1H, H-1 Gal, J_2 8 Hz), 4,985 (d, 1H, H-1 Glc, J_2 9 Hz).

Die Verbindung **Neu5Ac-Gab-Ad-ONp (15)** wurde auf analoge Weise ausgehend von **(3)** und Neu5Ac α -OCH₂(*p*-C₆H₄)-NHCOCH₂NH₂ (US Patent 5,571,836, 1996) hergestellt .

¹H-NMR Spektrum (CD₃OD, δ , ppm): 1,968 (dd, 1H, H-3_{ax} Neu5Ac), 1,980 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CO), 2,205 (s, 3H, NCOCH₃), 2,565 und 2,874 (t, 2x2H, J 6,8 Hz, 2 CH₂CO), 2,976 (dd, 1H, J_4 4,5 Hz, J_{3ax} 13 Hz, H-3_{eq} Neu5Ac), 3,743 (dd, 1H, J_6 1,5 Hz, J_8 9 Hz, H-7 Neu5Ac), 3,821 (dd, 1H, J_5 10 Hz, H-6 Neu5Ac), 3,840 (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J_8 6 Hz, H-9a Neu5Ac), 3,924 (ddd, 1H, H-4 Neu5Ac), 3,978 (ddd, 1H, H-5 Neu5Ac), 4,047 (dd, 1H, J_8 2 Hz, H-9b Neu5Ac), 4,083 (ddd, 1H, H-8 Neu5Ac), 4,196 (s, 2H, COCH₂NH), 4,653 und 4,973 (d, 2x1H, J 11 Hz, OCH₂Ar), 7,474 und 7,707 (d, 2x2H, J 8,3 Hz, *p*-C₆H₄NH), 7,561 und 8,467 (d, 2x2H, J 8,8 Hz, *p*-C₆H₄NO₂).

Die Verbindung **Gal α 1-3Gal β -O(CH₂)₃NHCO(CH₂)₄COO(*p*-C₆H₄NO₂) (16)** wurde auf analoge Weise ausgehend von **(3)** und Gal α 1-3Gal β -O(CH₂)₃NH₂ **(13)** hergestellt.

¹H-NMR Spektrum (D₂O, δ , ppm): 1,78 (m, 4H, CH₂CH₂), 1,89 (m, 2H, CH₂), 2,36 (t, 2H, CH₂COO), 2,77 (m, 2H, NHCOCH₂), 3,36 (m, 2H, CH₂N), 3,69 (t, 1H, J_3 9 Hz, 2-Gal β), 3,76 (m, 1H, OCH'), 3,78 (m, 6,6'-Gal α), 3,91 (dd, 1H, J_3 10 Hz, 2-Gal α), 4,00 (dd, 1H, 3-Gal α), 4,01 (m, 1H, OCH), 4,06 (verb. d, 1H, 4-Gal α), 4,20 (verb. d, 1H, 4-Gal β), 4,23 (verb. t, 1H, 5-Gal α), 4,48 (d, 1H, J_2 8 Hz, 1-Gal β), 5,19 (d, 1H, J_2 4 Hz, 1-Gal α), 8,38, 7,43 (d, 2x2H, J 9,5 Hz, Ar).

Beispiel 4.

Tetra-(*N*-tert.-butyloxycarbonyl-pentaglycidamidomethyl)methan

[BocGly₅-NHCH₂-]₄C (21).

1mM der Verbindung **(19)** (siehe Tabelle 5) wurde in 4 ml CF₃COOH aufgenommen und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 4ml Toluol versetzt, im Vakuum eingedampft und getrocknet. Der Rückstand wurde in 5ml Wasser gelöst, mit 4 ml einer 2M HCl-Lösung versetzt und eingeeengt. Das erhaltene Tetrahydrochlorid **(19a)** wurde im Vakuum getrocknet, in 0.5ml DMF

suspendiert, mit 6 mM BocGlyGlyNOS und 0.5 ml NEt₃ versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingeeengt und das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt. Nach Trocknen im Vakuum wurde die Verbindung (**21**) als weißes Pulver in 69% Ausbeute erhalten (s. Tabelle 5).

Die Verbindungen (**17**)-(20), (**22**)-(25) wurden auf analoge Weise hergestellt (siehe Tabelle 5).

¹H-NMR-Spektren (Für die Zuordnung der ¹H-NMR-Signale wurden die Glycine innerhalb der Ketten nummeriert, diese Nummerierung beginnt jeweils am N-terminalen Ende der Ketten)

[BocGly-NHCH₂]₄C (17). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ, ppm): 1,366 (s, 9H, OCMe₃), 2,759 (verb. d, 2H, CCH₂), 3,494 (d, 2H, J_{NH} 6 Hz, CH₂^{Gly}), 7,368 (t, 1H, NH^{Gly}), 7,969 (verb. t, 1H, CCH₂NH), Massenspektrum: 783 (M+Na).

[HCl·Gly₂-NHCH₂]₄C (18a). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): 2,952 (s, 2H, CCH₂), 3,966 (s, 2H, CH₂^{Gly}), 4,013 (s, 2H, CH₂^{Gly}).

[BocGly₃-NHCH₂]₄C (19). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ, ppm): 1,375 (s, 9H, OCMe₃), 2,690 (verb. d, 2H, J_{NH} 6,5 Hz, CCH₂), 3,586 (d, 2H, J_{NH} 6 Hz, CH₂^{Gly3}), 3,725 (d, 2H, J_{NH} 5,5 Hz, CH₂^{Gly1}), 3,847 (d, 2H, J_{NH} 5,5 Hz, CH₂^{Gly2}), 6,976 (t, 1H, NH^{Gly3}), 7,811 (t, 1H, NH^{Gly2}), 7,975 (t, 1H, CCH₂NH), 8,534 (t, 1H, NH^{Gly1}). Massenspektrum: 1239 (M+Na).

[BocGly₄-NHCH₂]₄C (20). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ, ppm): 1,374 (s, 9H, OCMe₃), 2,694 (verb. d, 2H, CCH₂), 3,575 (d, 2H, CH₂^{Gly4}), 3,707 (d, 2H, CH₂^{Gly1}), 3,750 (d, 2H, CH₂^{Gly3}), 3,835 (d, 2H, CH₂^{Gly2}), 6,980 (t, 1H, NH^{Gly4}), 7,827 (t, 1H, CCH₂NH), 8,048 (t, 1H, NH^{Gly3}), 8,096 (t, 1H, NH^{Gly2}), 8,590 (t, 1H, NH^{Gly1}). Massenspektrum: 1467 (M+Na).

[BocGly₅-NHCH₂]₄C (21). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ, ppm): 1,380 (s, 9H, OCMe₃), 2,688 (verb. d, 2H, CCH₂), 3,579 (d, 2H, J_{NH} 6 Hz, CH₂^{Gly6}), 3,718 (d, 2H, J_{NH} 5 Hz, CH₂^{Gly1}), 3,750 (d, 4H, J_{NH} ~5 Hz, CH₂^{Gly3,4}), 3,840 (d, 2H, J_{NH} 5,5 Hz, CH₂^{Gly2}), 6,974 (t, 1H, NH^{Gly5}), 7,770 (t, 1H, CCH₂NH), 8,006 (t, 1H, NH^{Gly4}), 8,075 und 8,102 (t, 1H, NH^{Gly2,3}), 8,550 (t, 1H, NH^{Gly1}). Massenspektrum: 1695 (M+Na), 1711(M+K).

[BocGly₇-NHCH₂]₄C (22). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ, ppm): 1,378 (s, 9H, OCMe₃), 2,688 (verb., 2H, CCH₂), 3,581 (d, 2H, CH₂^{Gly7}), 3,723 (verb. d, 2H, CH₂^{Gly1}), 3,751 (m, 8H, CH₂^{Gly3-6}), 3,840 (verb. d, 2H, CH₂^{Gly2}), 6,970 (verb. t, 1H, NH^{Gly7}), 7,814 (verb. t, 1H, CCH₂NH), 8,018 (verb. t, 1H, NH^{Gly6}), 8,081, 8,085, 8,092 und 8,118 (m, 4H, NH^{Gly2-5}), 8,545 (verb. t, 1H, NH^{Gly1}).

[HCl·AC-Gly₅-NHCH₂]₄C (23a). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): 1,446 (m, 2H, CH₂), 1,689 (m, 2H, COCH₂CH₂), 1,724 (m, 2H, CH₂CH₂N), 2,398 (t, 2H, J 7,4 Hz, COCH₂), 2,967 (verb. s, CCH₂), 3,044 (t, 2H, J 7,4 Hz, CH₂N), 3,994, 4,012, 4,049 (x2) und 4,096 (s, 10H, 5 COCH₂N).

[HCl·AC₂-Gly₅-NHCH₂]₄C (24a). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): 1,336 und 1,382 (m, 4H, 2 CH₂), 1,548 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,656 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 1,712 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 2,283 (t, 2H, J 7,4 Hz, COCH₂), 2,370 (t, 2H, J 7,4 Hz, COCH₂NHCOCH₂), 2,955 (verb. s, CCH₂), 3,031 (t, 2H, J 7,4 Hz, CH₂N⁺), 3,206 (t, 2H, J 6,6 Hz, CH₂N), 3,988, 4,00, 4,044 (x2) und 4,091 (s, 10H, 5 COCH₂N).

[HCl·AC₃-Gly₅-NHCH₂]₄C (25a). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): 1,34-1,42 (m, 6H, 3 CH₂), 1,551 (m, 4H, 2 CH₂CH₂N), 1,653 (x2) und 1,689 (m, 6H, 3 COCH₂CH₂), 1,717 (m, 2H, CH₂CH₂N⁺), 2,270 und 2,288 (t, 4H, J 7,5 Hz, 2 COCH₂), 2,376 (t, 2H, J 7,5 Hz, COCH₂NHCOCH₂), 2,952 (verb. s, CCH₂), 3,033 (t, 2H, J 7,5 Hz, CH₂N⁺), 3,208 (t, 4H, J 7 Hz, 2 CH₂N), 3,990, 4,004, 4,049 (x2) und 4,097 (s, 10H, 5 COCH₂N).

Tabelle 5. Herstellung tetravalenter Matrizen (17)-(25) (Beispiel 4)

Tabelle 5. Herstellung tetravalenter Matrizen (17)-(25) (Beispiel 4)

Erzeugnis	Ausgangs- verbindung	Carboxylat	Bedingungen	DC	Isolierung der Produkte	Ausbeute %			
				Boc-Derivat					
				R _f	Eluent	Tetrahydrochlorid			
						Eluent			
[BocGly-NHCH ₂] ₄ C (17)	(1)	6 mM BocGlyNOS		0.5	D	0.72	F	Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingedampft und (17) durch Kristallisation aus Trifluormethanol nach Zugabe von CH ₂ Cl ₂ /Ethylacetat/MeOH (9/3/1) erhalten.	78
[BocGly ₂ -NHCH ₂] ₄ C (18)	(11)		24 Stunden rühren in DMF Raumtemperatur	-	-	0.72			95
[BocGly ₃ -NHCH ₂] ₄ C (19)	(17)	6 mM BocGlyGlyNOS		0.79	Aceton/ MeOH/ H ₂ O 15:1:1	0.61			77
[BocGly ₄ -NHCH ₂] ₄ C (20)	(18)			0.48	E	0.55		Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingedampft. Säulenchromatographie: Aceton/MeOH/H ₂ O 30:1:1 → 10:1:1	63
[BocGly ₅ -NHCH ₂] ₄ C (21)	(19)			0.36		0.33			69
[BocGly ₇ -NHCH ₂] ₄ C (22)	(21)			-	-	0.67			93
[Boc-AC-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C (23)	(21)			0.38		0.22	2N HCl	Das Produkt (22) ist sehr wenig löslich, es wurde durch Filtration isoliert und nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen als Tetrahydrochlorid (22a) identifiziert. Die Produkte wurden nach Chromatographie über Sephadex LH-20, MeCN/H ₂ O 1:1 und nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen als Tetrahydrochloride (23a), (24a) und (25a) identifiziert.	71
[Boc-AC ₂ -Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C (24)	(23)	12 mM BocNH(CH ₂) ₂ - COONp	DMSO, 70°C, 72 Stunden	0.73	G	0.1			57
[Boc-AC ₃ -Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C (25)	(24)			0.4		-			40

Beispiel 5.

Herstellung der geschützten Tetrasialoside

Herstellung von $[Ac_4(OMe)Neu5Ac\alpha-OCH_2(p-C_6H_4)NHCOCH_2NH-CO(CH_2)_4CO-(NHCH_2CO)_5NHCH_2]_4C$

$[Ac_4(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly_5-NHCH_2-]_4C$ (31).

1mM der Verbindung (21) (siehe Tabelle 6) wurde in 4 ml CF_3COOH aufgenommen und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 4ml Toluol versetzt, im Vakuum eingedampft und getrocknet. Der Rückstand wurde in 5ml Wasser gelöst, mit 4 ml einer 2_M HCl-Lösung versetzt und eingeeengt. Das erhaltene Tetrahydrochlorid (21a) wurde im Vakuum getrocknet, in 0.5ml DMF suspendiert, mit 6 mM $Ac_4(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-ONp$ (8) und 0.5 ml NEt_3 versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingeeengt und das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (s.Tabelle 6). Nach Trocknen im Vakuum wurde die Verbindung (21) als farbloses amorphes Produkt in 65% Ausbeute erhalten.

Die Verbindungen (26)-(30), (32)-(36) wurden auf analoge Weise hergestellt (siehe Tabelle 6).

$[Ac_4(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-NHCH_2-]_4C$ (26). 1H -NMR Spektrum in D_6 -DMSO (δ , ppm): Matrix: 1.534 (m, 4H, 2 $COCH_2CH_2$), 2.171 (m, 4H, 2 $COCH_2CH_2$), 2.891 (verb., 2H, CCH_2), 3.867 (d, 2H, $ArNHCOCH_2$), 7.674 (verb. t, 1H, CCH_2NH), 8.107 (t, 1H, J 6 Hz, $NHCOCH_2CH_2$), 9.964 (s, 1H, $ArNH$); Neu5Ac α -2- $OCH_2C_6H_4$ -Fragment: 1.677, 1.918, 1.975, 2.024 und 2.094 (s, 15H, 5 $COCH_3$), 1.761 (dd, 1H, J_4 12.2 Hz, H-3ax), 2.570 (dd, 1H, J_{3ax} 12.5 Hz, J_4 4.6 Hz, H-3eq), 3.697 (s, 3H, $COOCH_3$), 3.904 (ddd, 1H, J_4 10.3 Hz, H-5), 4.028 (dd, 1H, J_8 6.3 Hz, H-9b), 4.087 (dd, 1H, J_5 10.7 Hz, H-6), 4.233 (dd, 1H, J_{9b} 12.5 Hz, J_8 3 Hz, H-9a), 4.320 und 4.643 (d, 2H, J 11.8 Hz, $ArCH_2$), 4.711 (ddd, 1H, H-4), 5.192 (dd, 1H, J_8 8.4 Hz, J_6 2.4 Hz, H-7), 5.341 (ddd, 1H, H-8), 7.214 und 7.555 (d, 2H, J 8.6 Hz, Ar), 7.708 (d, 1H, J_5 9.6 Hz, NH).

$[Ac_4(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly-NHCH_2-]_4C$ (27). 1H -NMR Spektrum in D_6 -DMSO (δ , ppm): Matrix: 1.509 (m, 4H, 2 $COCH_2CH_2$), 2.147 und 2.231 (m, 4H, 2 $COCH_2CH_2$), 2.674 (verb., 2H, CCH_2), 3.647

(m, 2H, Gly), 3.859 (d, 2H, ArNHCOCH₂), 7.852 (verb. t, 1H, CCH₂NH), 8.100 (t, 1H, J 6 Hz, NHCOCH₂CH₂), 8.453 (t, 1H, J 6 Hz, NHGly), 9.962 (s, 1H, ArNH). Neu5Ac α 2-OCH₂C₆H₄-Fragment: 1.677, 1.918, 1.975, 2.024 und 2.094 (s, 15H, 5 COCH₃), 1.761 (dd, 1H, J₄ 12.2 Hz, H-3ax), 2.570 (dd, 1H, J_{3ax} 12.5 Hz, J₄ 4.6 Hz, H-3eq), 3.697 (s, 3H, COOCH₃), 3.904 (ddd, 1H, J₄ 10.3 Hz, H-5), 4.028 (dd, 1H, J₈ 6.3 Hz, H-9b), 4.087 (dd, 1H, J₅ 10.7 Hz, H-6), 4.233 (dd, 1H, J_{9b} 12.5 Hz, J₈ 3 Hz, H-9a), 4.320 und 4.643 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH₂), 4.711 (ddd, 1H, H-4), 5.192 (dd, 1H, J₈ 8.4 Hz, J₆ 2.4 Hz, H-7), 5.341 (ddd, 1H, H-8), 7.214 und 7.555 (d, 2H, J 8.6 Hz, Ar), 7.708 (d, 1H, J₅ 9.6 Hz, NH).

[Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly₂-NHCH₂]₄C (28). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ , ppm): Matrix: 1.495 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2.150 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2.694 (verb., 2H, CCH₂), 3.716 (d, 2H, CH₂Gly₂), 3.818 (d, 2H, CH₂Gly¹), 3.865 (d, 2H, ArNHCOCH₂), 7.824 (verb. t, 1H, CCH₂NH), 7.993 (t, 1H, J 6 Hz, NH^{Gly²}), 8.096 (t, 1H, J 6 Hz, NHCOCH₂CH₂), 8.544 (t, 1H, J 6 Hz, NH^{Gly¹}), 9.975 (s, 1H, ArNH). Neu5Ac α 2-OCH₂C₆H₄-Fragment: 1.677, 1.918, 1.975, 2.024 und 2.094 (s, 15H, 5 COCH₃), 1.761 (dd, 1H, J₄ 12.2 Hz, H-3ax), 2.570 (dd, 1H, J_{3ax} 12.5 Hz, J₄ 4.6 Hz, H-3eq), 3.697 (s, 3H, COOCH₃), 3.904 (ddd, 1H, J₄ 10.3 Hz, H-5), 4.028 (dd, 1H, J₈ 6.3 Hz, H-9b), 4.087 (dd, 1H, J₅ 10.7 Hz, H-6), 4.233 (dd, 1H, J_{9b} 12.5 Hz, J₈ 3 Hz, H-9a), 4.320 und 4.643 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH₂), 4.711 (ddd, 1H, H-4), 5.192 (dd, 1H, J₈ 8.4 Hz, J₆ 2.4 Hz, H-7), 5.341 (ddd, 1H, H-8), 7.214 und 7.555 (d, 2H, J 8.6 Hz, Ar), 7.708 (d, 1H, J₅ 9.6 Hz, NH).

[Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly₃-NHCH₂]₄C (29). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ , ppm): Matrix: 1.498 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2.143 und 2.158 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2.693 (verb., 2H, CCH₂), 3.728 (m, 4H, 2 CH₂Gly^{2,3}), 3.841 (d, 2H, CH₂Gly¹), 3.862 (d, 2H, ArNHCOCH₂), 7.820 (verb. t, 1H, CCH₂NH), 8.049 und 8.059 (t, 2H, J 5.7 Hz, NH^{Gly^{2,3}}), 8.098 (t, 1H, J 5.8 Hz, NHCOCH₂CH₂), 8.547 (t, 1H, J 5.5 Hz, NH^{Gly¹}), 9.972 (s, 1H, ArNH). Neu5Ac α 2-OCH₂C₆H₄-Fragment: 1.677, 1.918, 1.975, 2.024 und 2.094 (s, 15H, 5 COCH₃), 1.761 (dd, 1H, J₄ 12.2 Hz, H-3ax), 2.570 (dd, 1H, J_{3ax} 12.5 Hz, J₄ 4.6 Hz, H-3eq), 3.697 (s, 3H, COOCH₃), 3.904 (ddd, 1H, J₄ 10.3 Hz, H-5), 4.028 (dd, 1H, J₈ 6.3 Hz, H-9b), 4.087 (dd, 1H, J₅ 10.7 Hz, H-6), 4.233 (dd, 1H, J_{9b} 12.5 Hz, J₈ 3 Hz, H-9a), 4.320 und 4.643 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH₂), 4.711 (ddd, 1H, H-4), 5.192 (dd, 1H, J₈ 8.4 Hz, J₆ 2.4 Hz, H-7), 5.341 (ddd, 1H, H-8), 7.214 und 7.555 (d, 2H, J 8.6 Hz, Ar), 7.708 (d, 1H, J₅ 9.6 Hz, NH).

[Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly₄-NHCH₂]₄C (30). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ , ppm), Matrix: 1.500 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2.151 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2.688 (verb., 2H, CCH₂), 3.720 (x2) und 3.753 (d, 6H, 3 CH₂Gly²⁻⁴), 3.841 (d, 2H, CH₂Gly¹), 3.864 (d, 2H, ArNHCOCH₂), 7.818 (verb. t, 1H, CCH₂NH), 8.045 und 8.084 (x2) (t, 3H, J 6 Hz, NH^{Gly²⁻⁴}), 8.102 (t, 1H, J 6 Hz, NHCOCH₂CH₂), 8.555 (t, 1H, J 5.5 Hz, NH^{Gly¹}), 9.980 (s, 1H, ArNH). Neu5Ac α 2-OCH₂C₆H₄-Fragment: 1.677, 1.918, 1.975, 2.024 und 2.094 (s, 15H, 5 COCH₃), 1.761 (dd, 1H, J₄ 12.2 Hz, H-3ax), 2.570 (dd, 1H, J_{3ax} 12.5 Hz, J₄ 4.6 Hz, H-3eq), 3.697 (s, 3H, COOCH₃), 3.904 (ddd, 1H, J₄ 10.3 Hz, H-5), 4.028 (dd, 1H, J₈ 6.3 Hz, H-9b), 4.087 (dd, 1H, J₅ 10.7 Hz, H-6), 4.233 (dd, 1H, J_{9b} 12.5 Hz, J₈ 3 Hz, H-9a), 4.320 und 4.643

(d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH₂), 4.711 (ddd, 1H, H-4), 5.192 (dd, 1H, J₈ 8.4 Hz, J₆ 2.4 Hz, H-7), 5.341 (ddd, 1H, H-8), 7.214 und 7.555 (d, 2H, J 8.6 Hz, Ar), 7.708 (d, 1H, J₅ 9.6 Hz, NH).

[Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly₅-NHCH₂]₄C (31). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ, ppm): Matrix: 1.502 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2.147 und 2.159 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2.688 (verb., 2H, CCH₂), 3.738 (x2) und 3.765 (x2) (m, 8H, 4 CH₂^{Gly2-5}), 3.857 (d, 2H, CH₂^{Gly1}), 3.877 (d, 2H, ArNHCOCH₂), 7.818 (verb. t, 1H, CCH₂NH), 8.074 (m, 5H, NHCOCH₂CH₂, NH^{Gly2-5}), 8.551 (t, 1H, J 6 Hz, NH^{Gly1}), 9.968 (s, 1H, ArNH). Neu5Acα2-OCH₂C₆H₄-Fragment: 1.677, 1.918, 1.975, 2.024 und 2.094 (s, 15H, 5 COCH₃), 1.761 (dd, 1H, J₄ 12.2 Hz, H-3ax), 2.570 (dd, 1H, J_{3ax} 12.5 Hz, J₄ 4.6 Hz, H-3eq), 3.697 (s, 3H, COOCH₃), 3.904 (ddd, 1H, J₄ 10.3 Hz, H-5), 4.028 (dd, 1H, J₈ 6.3 Hz, H-9b), 4.087 (dd, 1H, J₅ 10.7 Hz, H-6), 4.233 (dd, 1H, J_{9b} 12.5 Hz, J₈ 3 Hz, H-9a), 4.320 und 4.643 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH₂), 4.711 (ddd, 1H, H-4), 5.192 (dd, 1H, J₈ 8.4 Hz, J₆ 2.4 Hz, H-7), 5.341 (ddd, 1H, H-8), 7.214 und 7.555 (d, 2H, J 8.6 Hz, Ar), 7.708 (d, 1H, J₅ 9.6 Hz, NH).

[Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-AC₂-Gly₅-NHCH₂]₄C (32). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ, ppm), Matrix: 1.224, 1.366 und 1.469 (m, 12H, 6 CH₂), 1.502 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2.032 und 2.121 (m, 2 COCH₂),), 2.147 und 2.159 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2.688 (verb., 2H, CCH₂), 3.00 (m, 4H, 2 CH₂NHCO), 3.738 (x2) und 3.765 (x2) (m, 8H, 4 CH₂^{Gly2-5}), 3.857 (d, 2H, CH₂^{Gly1}), 3.877 (d, 2H, ArNHCOCH₂), 7.679 und 7.700 (verb. t, 2H, 2 NHCO), 7.818 (verb. t, 1H, CCH₂NH), 8.074 (m, 5H, NHCOCH₂CH₂, NH^{Gly2-5}), 8.551 (t, 1H, J 6 Hz, NH^{Gly1}), 9.968 (s, 1H, ArNH). Neu5Acα2-OCH₂C₆H₄-Fragment: 1.677, 1.918, 1.975, 2.024 und 2.094 (s, 15H, 5 COCH₃), 1.761 (dd, 1H, J₄ 12.2 Hz, H-3ax), 2.570 (dd, 1H, J_{3ax} 12.5 Hz, J₄ 4.6 Hz, H-3eq), 3.697 (s, 3H, COOCH₃), 3.904 (ddd, 1H, J₄ 10.3 Hz, H-5), 4.028 (dd, 1H, J₈ 6.3 Hz, H-9b), 4.087 (dd, 1H, J₅ 10.7 Hz, H-6), 4.233 (dd, 1H, J_{9b} 12.5 Hz, J₈ 3 Hz, H-9a), 4.320 und 4.643 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH₂), 4.711 (ddd, 1H, H-4), 5.192 (dd, 1H, J₈ 8.4 Hz, J₆ 2.4 Hz, H-7), 5.341 (ddd, 1H, H-8), 7.214 und 7.555 (d, 2H, J 8.6 Hz, Ar), 7.708 (d, 1H, J₅ 9.6 Hz, NH).

[Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-AC₃-Gly₅-NHCH₂]₄C (33). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ, ppm) ist dem Spektrum der Verbindung (32) sehr ähnlich (die Signale sind zum Teil stärker verbreitert und die Integrale der Amidocaprinsäure-Gruppen sind entsprechend größer).

[Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-AC-Ad-Gly₅-NHCH₂]₄C (34). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ, ppm): Matrix: 1.250, 1.382, 1.465 und 1.506 (m, 10H, 5 CH₂), 2.033 und 2.140 (m, 6H, 3 COCH₂), 2.697 (verb., 2H, CCH₂), 3.009 (m~q, 2H, J 6.4 Hz, CH₂NHCO), 3.719 (x2) und 3.748 (x2) (m, 8H, 4 CH₂^{Gly2-5}), 3.843 (d, 2H, CH₂^{Gly1}), 3.862 (d, 2H, ArNHCOCH₂), 4.327 und 4.648 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH₂), 7.216 und 7.555 (d, 2H, J 8 Hz, Ar), 7.698 (t, 1H, NHCO), 7.818 (verb. t, 1H, CCH₂NH), 8.039, 8.072, 8.084 (x2), 8.110 (m, 5H, NHCOCH₂CH₂, NH^{Gly2-5}), 8.547 (t, 1H, NH^{Gly1}), 9.970 (s, 1H, ArNH). Neu5Acα2-OCH₂C₆H₄-Fragment: 1.677, 1.918, 1.975, 2.024 und 2.094 (s, 15H, 5 COCH₃), 1.761 (dd, 1H, J₄ 12.2 Hz, H-3ax), 2.570 (dd, 1H, J_{3ax} 12.5 Hz, J₄ 4.6 Hz, H-3eq), 3.697 (s, 3H, COOCH₃), 3.904 (ddd, 1H, J₄ 10.3 Hz, H-5), 4.028 (dd, 1H, J₈ 6.3 Hz, H-9b), 4.087 (dd, 1H, J₅ 10.7 Hz, H-6), 4.233

(dd, 1H, J_{9b} 12.5 Hz, J_8 3 Hz, H-9a), 4.320 und 4.643 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH_2), 4.711 (ddd, 1H, H-4), 5.192 (dd, 1H, J_8 8.4 Hz, J_6 2.4 Hz, H-7), 5.341 (ddd, 1H, H-8), 7.214 und 7.555 (d, 2H, J 8.6 Hz, Ar), 7.708 (d, 1H, J_5 9.6 Hz, NH).

[Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-AC₂-Ad-Gly₅-NHCH₂]₄C (35). ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO (δ , ppm): Matrix: 1.239, 1.375, 1.465 und 1.509 (m, CH₂), 2.026 und 2.142 (m, COCH₂), 2.711 (verb., 2H, CCH₂), 3.003 (m, 4H, 2 CH₂NHCO), 3.718 (x2) und 3.746 (x2) (m, 8H, 4 CH₂^{Gly2-5}), 3.839 (d, 2H, CH₂^{Gly1}), 3.861 (d, 2H, ArNHCOCH₂), 4.329 und 4.649 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH_2), 7.218 und 7.561 (d, 2H, J 8 Hz, Ar), 7.681 und 7.695 (m, 2H, 2 NHCO), 7.834 (verb. t, 1H, CCH₂NH), 8.077, 8.133 (x3), 8.177 (m, 5H, NHCOCH₂CH₂, NH^{Gly2-5}), 8.587 (t, 1H, NH^{Gly1}), 10.01 (s, 1H, ArNH). Neu5Ac α 2-OCH₂C₆H₄-Fragment: 1.677, 1.918, 1.975, 2.024 und 2.094 (s, 15H, 5 COCH₃), 1.761 (dd, 1H, J_4 12.2 Hz, H-3ax), 2.570 (dd, 1H, J_{3ax} 12.5 Hz, J_4 4.6 Hz, H-3eq), 3.697 (s, 3H, COOCH₃), 3.904 (ddd, 1H, J_4 10.3 Hz, H-5), 4.028 (dd, 1H, J_8 6.3 Hz, H-9b), 4.087 (dd, 1H, J_5 10.7 Hz, H-6), 4.233 (dd, 1H, J_{9b} 12.5 Hz, J_8 3 Hz, H-9a), 4.320 und 4.643 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH_2), 4.711 (ddd, 1H, H-4), 5.192 (dd, 1H, J_8 8.4 Hz, J_6 2.4 Hz, H-7), 5.341 (ddd, 1H, H-8), 7.214 und 7.555 (d, 2H, J 8.6 Hz, Ar), 7.708 (d, 1H, J_5 9.6 Hz, NH).

[Ac₄(OMe)Neu5Ac-Gab-AC₃-Ad-Gly₅-NHCH₂]₄C (36). Das ¹H-NMR Spektrum in D₆-DMSO entspricht weitestgehend dem Spektrum der Verbindung (35), die Signale sind zum Teil stärker verbreitert. Matrix (δ , ppm): 1.239, 1.375, 1.465 und 1.509 (m, CH₂), 2.026 und 2.142 (m, COCH₂), 2.629 (verb., 2H, CCH₂), 3.00 (m, 6H, 3 CH₂NHCO), 3.813 (verb., 2H, CH₂^{Gly1}), 3.861 (d, 2H, ArNHCOCH₂), 4.329 und 4.649 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH_2), 7.218 und 7.561 (d, 2H, J 8 Hz, Ar), 7.693 (m, 3H, 3 NHCO), 7.904 (verb., 1H, CCH₂NH), 8.083 (x2), 8.158 und 8.215 (x2) (m, 5H, NHCOCH₂CH₂, NH^{Gly2-5}), 8.538 (t, 1H, NH^{Gly1}). Neu5Ac α 2-OCH₂C₆H₄-Fragment: 1.677, 1.918, 1.975, 2.024 und 2.094 (s, 15H, 5 COCH₃), 1.761 (dd, 1H, J_4 12.2 Hz, H-3ax), 2.570 (dd, 1H, J_{3ax} 12.5 Hz, J_4 4.6 Hz, H-3eq), 3.697 (s, 3H, COOCH₃), 3.904 (ddd, 1H, J_4 10.3 Hz, H-5), 4.028 (dd, 1H, J_8 6.3 Hz, H-9b), 4.087 (dd, 1H, J_5 10.7 Hz, H-6), 4.233 (dd, 1H, J_{9b} 12.5 Hz, J_8 3 Hz, H-9a), 4.320 und 4.643 (d, 2H, J 11.8 Hz, ArCH_2), 4.711 (ddd, 1H, H-4), 5.192 (dd, 1H, J_8 8.4 Hz, J_6 2.4 Hz, H-7), 5.341 (ddd, 1H, H-8), 7.214 und 7.555 (d, 2H, J 8.6 Hz, Ar), 7.708 (d, 1H, J_5 9.6 Hz, NH).

Tabelle 6. Herstellung der geschützten Tetrasialoside (26)-(36) (Beispiel 5)

Endprodukte		Matrix	Glycosid	Bedingungen	DC		Isolierung der Produkte	Ausbeute %
Methylesterperacetat					R _f	Eluent		
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-NHCH ₂] ₄ C (26)		(1)		DMF, 24 Stunden Kühlung unter Raumtemperatur	0.21	C	Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingedampft; LC: CHCl ₃ /MeOH 10:1	57
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly-NHCH ₂] ₄ C (27)		(17)	6 mM		0.51	E	Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingedampft; LC: i-PrOH/EtOAc/H ₂ O 2:5:1	66
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly ₂ NHCH ₂] ₄ C (28)		(18)	(8)		0.25	E	Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingedampft; LC: Aceton/MeOH/H ₂ O 20:1:1→5:1:1	63
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly ₃ NHCH ₂] ₄ C (29)		(19)			0.23	E	Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingedampft; LC: Aceton/MeOH/H ₂ O 30:1:1→10:1:1	33
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly ₄ NHCH ₂] ₄ C (30)		(20)		DMSO, 70°C, 72 Stunden	0.40	G	Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingedampft; LC: Aceton/MeOH/H ₂ O 15:1:1→5:1:1	68
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-Gly ₅ NHCH ₂] ₄ C (31)		(21)			0.18	G	Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingedampft; LC: Aceton/MeOH/H ₂ O 20:1:1→5:1:1	65
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-AC ₂ Gly ₅ NHCH ₂] ₄ C (32)		(24)	12 mM		0.15	G	Sepladex LH-20, MeCN/H ₂ O 1:1	60
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-Ad-AC ₃ Gly ₅ NHCH ₂] ₄ C (33)		(25)	(9)		0.45	H		57
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-AC-Ad-Gly ₅ NHCH ₂] ₄ C (34)		(21)	12 mM		0.16	G	Reaktionsgemisch wurde lyophilisiert; LC: Eluent G, dann i-PrOH/MeOH/EtOAc/H ₂ O 4:3:3	76
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-AC ₂ Ad-Gly ₅ NHCH ₂] ₄ C (35)		(21)	12 mM		0.11	G	Reaktionsgemisch wurde lyophilisiert; LC: Eluent G, dann H	46
[Ac ₄ (OMe)Neu5Ac-Gab-AC ₂ Ad-Gly ₅ NHCH ₂] ₄ C (36)		(21)	12 mM		0.84	H		11

Beispiel 6.

Herstellung der freien Tetrasialoside

Herstellung von $[Neu5Ac\alpha-OCH_2(p-C_6H_4)NHCOCH_2NH-CO(CH_2)_4CO-(NH(CH_2)_5CO)_3-(NHCH_2CO)_5-NHCH_2-]_4C$ (Ammonium Salz)

Neu5Ac-Gab-Ad-AC₃-Gly₅-NHCH₂]₄C (44).

Zu einer Lösung von 10 μ M des geschützten Tetrasialosids (33) in 3ml absoluten MeOH wurden 80 μ l 2N NaOH Lösung zugegeben, nach 3 Stunden wurden nochmals 1,5 ml Wasser und 80 μ l 2N NaOH Lösung zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit 80 μ l AcOH versetzt und zur Trockne eingedampft. Das Produkt wurde mittels Gelchromatographie über Sephadex G-10 mit einer 0,05 M wässrigen NH₄OH-Lösung erhalten.

(siehe Tabelle 7).

Die Verbindungen (37)-(43), (45)-(47) wurden in analoger Weise erhalten (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7 (Beispiel 6)

Tetrasialoside	Ausgangs- verbindung	DC, Eluent H, R _f	Aggregat, % *	Ausbeute %
[Neu5Ac-Gab-Ad-NHCH ₂] ₄ C (37)	(26)	0,80	Keine Selbst- assoziation	76
[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly-NHCH ₂] ₄ C (38)	(27)	0,82		81
[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly ₂ -NHCH ₂] ₄ C (39)	(28)	0,81		91
[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly ₃ -NHCH ₂] ₄ C (40)	(29)	0,77		90
[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly ₄ -NHCH ₂] ₄ C (41)	(30)	0,75		83
[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C (42)	(31)	0,71		83
[Neu5Ac-Gab-Ad-AC ₂ -Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C (43)	(32)	Monomer und Aggregat werden getrennt eluiert;	6	87
[Neu5Ac-Gab-Ad-AC ₃ -Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C (44)	(33)	Monomer: R _f = 0,6	54	90
[Neu5Ac-Gab-AC-Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C (45)	(34)	Aggregat: R _f = 0	12	93
[Neu5Ac-Gab-AC ₂ -Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C (46)	(35)		92	86
[Neu5Ac-Gab-AC ₃ -Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C (47)	(36)		96	89

* Bestimmt mittels Gelpermeations-Chromatographie

[Neu5Ac-Gab-Ad-NHCH₂]₄C (37). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): Matrix: 1,633 (m, 4H, COCH₂CH₂), 2,293 und 2,358 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2,943 (s, 2H, CCH₂), 4,003 (s, 2H, ArNHCOCH₂). 4,493 und 4,718 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,388 (m, 4H, Ar). Neu5Acα-Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly-NHCH₂]₄C (38). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): Matrix: 1,622 (m, 4H, COCH₂CH₂), 2,340 und 2,382 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2,810 (s, 2H, CCH₂), 3,847 (s, 2H, CH₂^{Gly}), 4,016 (s, 2H, ArNHCOCH₂). 4,492 und 4,707 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,402 (m, 4H, Ar). Neu5Acα-Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly₂-NHCH₂]₄C (39). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): Matrix: 1,626 (m, 4H, COCH₂CH₂), 2,341 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2,831 (s, 2H, CCH₂), 3,894 und 3,991 (s, 4H, 2 CH₂^{Gly1,2}), 4,022 (s, 2H, ArNHCOCH₂). 4,492 und 4,719 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,402 (m, 4H, Ar). Neu5Acα-Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly₃-NHCH₂]₄C (40). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): Matrix: 1,631 (m, 4H, COCH₂CH₂), 2,344 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2,857 (s, 2H, CCH₂), 3,912, 3,931 und 4,024 (s, 6H, 3 CH₂^{Gly1-3}), 4,029 (s, 2H, ArNHCOCH₂). 4,500 und 4,725 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,408 (m, 4H, Ar). Neu5Acα-Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly₄-NHCH₂]₄C (41). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): Matrix: 1,636 (m, 4H, COCH₂CH₂), 2,350 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2,864 (s, 2H, CCH₂), 3,912, 3,934, 3,968 und 4,025 (s, 8H, 4 CH₂^{Gly1-4}), 4,032 (s, 2H, ArNHCOCH₂). 4,497 und 4,725 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,408 (m, 4H, Ar). Neu5Acα-Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly₅-NHCH₂]₄C (42). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): Matrix: 1,638 (m, 4H,

COCH₂CH₂), 2,355 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2,878 (s, 2H, CCH₂), 3,921, 3,933, 3,974 (x2) und 4,032 (s, 10H, 5 CH₂^{Gly1-5}), 4,036 (s, 2H, ArNHCOCH₂), 4,502 und 4,724 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,410 (m, 4H, Ar). Neu5Acα-Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

[Neu5Ac-Gab-Ad-AC₂-Gly₅-NHCH₂]₄C (43). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): Matrix: 1,286, 1,476 und 1,567 (m, 12H, 6 CH₂), 1,623 (m, 4H, COCH₂CH₂CH₂CH₂CO), 2,179 (t, 2H, J 7,4 Hz, CH₂CO), 2,245 und 2,367 (m, 4H, COCH₂CH₂CH₂CH₂CO), 2,299 (t, 2H, J 7,4 Hz, CH₂CO), 2,882 (s, 2H, CCH₂), 3,133 (m, 4H, 2 CH₂N), 3,928, 3,940, 3,987 (x2) und 4,043 (x2) (s, 12H, 6 COCH₂N), 4,502 und 4,730 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,418 (m, 4H, Ar). Neu5Acα-Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

Aggregat **[Neu5Ac-Gab-Ad-AC₃-Gly₅-NHCH₂]₄C (44).** ¹H-NMR Spektrum in D₂O ist dem Spektrum der Verbindung (43) sehr ähnlich,

Matrix (δ, ppm): 1,283, 1,476, 1,570 (m, 18H, 9 CH₂), 2,178 und 2,189 (t, 2x2H, J 7,4 Hz, 2 CH₂CO), 2,301 (t, 2H, J 7,4 Hz, CH₂CO), 3,135 (m, 6H, 3 CH₂N), 3,928, 3,940, 3,987 (x2) und 4,043 (x2) (s, 12H, 6 COCH₂N), 4,502 und 4,730 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,418 (m, 4H, Ar).

Neu5Acα-Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

[Neu5Ac-Gab-AC-Ad-Gly₅-NHCH₂]₄C (45). ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): Matrix: 1,334 (m, 2H, CH₂), 1,504 (m, 2H, CH₂CH₂NH), 1,569 (m, 4H, COCH₂CH₂CH₂CH₂CO), 1,625 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 2,207 und 2,313 (m, 4H, COCH₂CH₂CH₂CH₂CO), 2,344 (t, 2H, J 7 Hz, CH₂CO), 2,885 (s, 2H, CCH₂), 3,156 (t, 2H, J 7,4 Hz, CH₂N), 3,928, 3,942, 3,979, 3,984, 4,037 und 4,042 (s, 12H, 6 COCH₂N), 4,506 und 4,729 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,420 (m, 4H, Ar). Neu5Acα-Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

Aggregat **[Neu5Ac-Gab-AC₂-Ad-Gly₅-NHCH₂]₄C (46).** ¹H-NMR Spektrum in D₂O (δ, ppm): Matrix: 1,268, 1,504 und 1,630 (m, 12H, 6 CH₂), 1,572 (m, 4H, COCH₂CH₂CH₂CH₂CO), 2,185 (t, 2H, J 7 Hz, CH₂CO), 2,212 und 2,315 (m, 4H, COCH₂CH₂CH₂CH₂CO), 2,349 (t, 2H, J 7,4 Hz, CH₂CO), 2,898 (s, 2H, CCH₂), 3,130 und 3,158 (t, 2x2H, J 7,4 Hz, 2 CH₂N), 3,934, 3,945, 3,987 (x2), 4,039 und 4,045

(s, 12H, 6 COCH₂N), 4,509 und 4,725 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,422 (m, 4H, Ar). Neu5Ac α -Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

Aggregat **[Neu5Ac-Gab-AC₃-Ad-Gly₅-NHCH₂]₄C (47)**. Das ¹H-NMR Spektrum in D₂O ist dem Spektrum der Verbindung (46) sehr ähnlich, die Signale sind zum Teil stärker verbreitert.

Matrix (δ , ppm): 1,276, 1,461 und 1,630 (m, 18H, 9 CH₂), 2,186 (t, 2x2H, J 7 Hz, 2 CH₂CO), 2,349 (t, 2H, J 7,4 Hz, CH₂CO), 3,132 (m, 6H, 3 CH₂N), 3,934, 3,945, 3,987 (x2), 4,039 und 4,045 (s, 12H, 6 COCH₂N), 4,509 und 4,725 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,422 (m, 4H, Ar).

Neu5Ac α -Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq), 3,598 (dd, 1H, J₈ 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J₈ 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J₅ 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J₇ 1,5 Hz, J₅ 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J₈ 2,3 Hz, H-9a).

Beispiel 7.

Herstellung des Aggregats {[Neu5Ac α -OCH₂(p-C₆H₄)NHCOCH₂NH-CO(CH₂)₄CO-(NHCH₂CO)₇-NHCH₂]₄C}_x (Ammonium-Salz)

{[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly₇-NHCH₂]₄C}_x (48).

6,1 mg, (3,25 μ M) des Tetrahydrochlorids (22a), hergestellt wie im Beispiel 4 beschrieben, wurden in 0,5 ml Wasser mit 18,8 mg (26 μ M) der lyophilisierten Verbindung (15) versetzt. Der pH des Reaktionsgemisches wurde mit 1M NaHCO₃-Lösung auf pH=8 gestellt. Die Reaktionslösung wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt, wobei der pH durch Zugabe von 1M NaHCO₃-Lösung auf pH=8 gehalten wurde. Das Reaktionsgemisch wurde über eine Sephadex LH-20 Säule mit einer 0,05 M wässrigen NH₄OH-Lösung getrennt. Nach Einengen und Trocknen im Vakuum wurden 9,6mg des Produkts (48) erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 71%.

¹H-NMR Spektrum (D₂O, δ , ppm): Matrix: 1,638 (m, 4H, COCH₂CH₂), 2,358 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 2,878 (s, 2H, CCH₂), 3,918, 3,938, 3,978 (x4) und 4,034 (s, 14H, 7 CH₂^{Gly1-7}), 4,037 (s, 2H, ArNHCOCH₂), 4,498 und 4,718 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH₂), 7,408 (m, 4H, Ar). Neu5Ac α -Fragment : 1,680 (dd, 1H, J₄ 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,778 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J₄ 4,6 Hz, H-3eq),

3,598 (dd, 1H, J_8 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J_8 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J_5 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J_7 1,5 Hz, J_5 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, J_{9b} 12 Hz, J_8 2,3 Hz, H-9a).

Beispiel 8.

Herstellung von Aggregate



Herstellung von $\{Gal\alpha 1-3Gal\beta-O(CH_2)_3NH-CO(CH_2)_4CO-(NH(CH_2)_5CO)_3-$
 $(NHCH_2CO)_5-NHCH_2-[4C]_x\}$

$\{[B_{dl}-Ap-Ad-AC_3-Gly_5-NHCH_2-[4C]_x\} (49).$

Zu einer Suspension von 5,6mg (2μM) des Tetrahydrochlorids (25a), hergestellt wie im Beispiel 4 beschrieben, in 0,5ml DMSO wurden 15,6mg (16) und 5 μl Et₃N zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 3 Tage bei 40°C gerührt. Nach Zugabe von 0,2ml konz. NH₄OH-Lösung wurde das Reaktionsgemisch 30 Minuten gerührt und über eine Sephadex LH-20 Säule mit MeCN/H₂O 1:1 getrennt. Nach Einengen und Trocknen im Vakuum wurden 6.4mg des Produkts (49) erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 69%.



¹H-NMR Spektrum (D₂O/CD₃OD 2:1, δ, ppm): 1,374, 1,562 und 1,645 (m, CH₂), 1,883 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N), 2,265 (t, 4H, J 7.5 Hz, 2 CH₂CO), 2,292 (m, 4H, 2 CH₂CO), 2,377 (t, 2H, J 7.5 Hz, CH₂CO), 2,955 (verb. s, CCH₂), 3,213 (t, 6H, 3 CH₂N), 3,348 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N), 3,697 (dd, 1H, H-2 Galβ), 3,756 (m, OCH₂CH₂CH₂N), 3,910 (dd, 1H, J_3 10 Hz, H-2 Galα), 4,00, 4,046 und 4,097 (s, 10H, 5 COCH₂N), 4,205 (d, 1H, J_3 3 Hz, H-4 Galβ), 4,255 (m, 1H, H-5 Galα), 4,462 (d, 1H, J_2 8 Hz, H-1 Galβ), 5,184 (d, 1H, J_2 4 Hz, H-1 Galα).

Herstellung von $\{Neu5Ac\alpha 2-3Gal\beta 1-4Glc\beta NHCOCH_2NH-CO(CH_2)_4CO-(NHCH_2CO)_5-$
 $NHCH_2-[4C]_x\}$

$\{[3'SL-NHCOCH_2NH-Ad-Gly_5-NHCH_2-[4C]_x\} (50)$

wurde ausgehend von (21a) und (14) analog zur Verbindung (49) hergestellt.

DC: R_f 0.52 (Methanol/Acetonitril/Wasser 6:6:3). Ausbeute 65%.

$^1\text{H-NMR}$ Spektrum (D_2O , δ , ppm): 1,622 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,797 (dd, 1H, J_4 12 Hz, H-3_{ax} Neu5Ac), 2,017 (s, 3H, COCH_3), 2,342 (m, 4H, 2 CH_2CO), 2,744 (dd, 1H, $J_{3\text{ax}}$ 12.5 Hz, J_4 4.6 Hz, H-3_{eq} Neu5Ac), 2,895 (verb. s, CCH_2), 3,452 (dd, 1H, H-2 Glc β), 3,568 (dd, 1H, J_3 10 Hz, H-2 Gal β), 3,954, 3,992 und 4,041 (s, 12H, 6 COCH_2N), 4,105 (dd, 1H, J_2 10 Hz, J_4 3 Hz, H-3 Gal β), 4,523 (d, 1H, J_2 8 Hz, H-1 Gal β), 5,005 (d, 1H, J_2 9 Hz, H-1 Glc β).

Herstellung von $\{\text{Neu5Ac}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}\beta \text{NHCOCH}_2\text{NH-CO}(\text{CH}_2)_4\text{CO-(NHCH}_2\text{CO)}_7\text{-NHCH}_2\text{-I}_4\text{C}\}_x$

$\{[3'\text{SL-NHCOCH}_2\text{NH-Ad-Gly}_7\text{-NHCH}_2\text{-I}_4\text{C}]\}_x$ (51)

wurde ausgehend von (22a) und (14) analog zur Verbindung (48) hergestellt. Ausbeute 78%.

$^1\text{H-NMR}$ Spektrum (D_2O , δ , ppm): 1,622 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,797 (dd, 1H, J_4 12 Hz, H-3_{ax} Neu5Ac), 2,017 (s, 3H, COCH_3), 2,342 (m, 4H, 2 CH_2CO), 2,744 (dd, 1H, $J_{3\text{ax}}$ 12.5 Hz, J_4 4.6 Hz, H-3_{eq} Neu5Ac), 2,895 (verb. s, CCH_2), 3,452 (dd, 1H, H-2 Glc β), 3,568 (dd, 1H, J_3 10 Hz, H-2 Gal β), 3,954, 3,992 und 4,041 (s, 16H, 8 COCH_2N), 4,105 (dd, 1H, J_2 10 Hz, J_4 3 Hz, H-3 Gal β), 4,523 (d, 1H, J_2 8 Hz, H-1 Gal β), 5,005 (d, 1H, J_2 9 Hz, H-1 Glc β).

Beispiel 9

Induktion der Selbstassoziation von $[\text{Gly}_7\text{-NHCH}_2\text{-I}_4\text{C}]$ (22a).

Die Untersuchung der Lichtstreuung einer 50 mM Lösung der Verbindung (22a) in Wasser wurde mit einem Spectra-Physics 164 Argon Laser (Plasma Linien $\lambda=528.7$ and 611.5 nm) durchgeführt, die Streuung wurde in einem Winkel von 90° zum eintretenden Lichtstrahl gemessen. Die hierbei bestimmte Teilchengröße betrug ~~<2.5 nm. Zu dieser Lösung wurden 50 μl einer 0.8 M NaHCO_3 Lösung zugegeben.~~ Die Lichtstreuung wurde, wie oben beschrieben, vermessen, die hierbei bestimmte durchschnittliche Teilchengröße betrug 200-400 nm.

Zu dieser Lösung wurden 50 μl einer 0.8 M HCl zugegeben, und die Probe mittels Lichtstreuung, wie oben beschrieben, untersucht. Die hierbei bestimmte Teilchengröße betrug < 2.5 nm.

Beispiel 10

Inhibition der viralen Zell-Adhäsion von Influenza-Viren

Die spezifischen Bindungskonstanten der Inhibitor-Virus-Komplexe wurden mittels eines Fetuin-Binding-Assay, wie in der Literatur beschrieben, bestimmt (US Patent 5,571,836, 1996; PCT WO 98/14215).

Tabelle 8, Beispiel 10

Influenza virus A/NIB/44/90M H3N2

Inhibitor	Verbindung Nr.	K_d , μ M
Neu5Ac α -OBn		100
[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly _n -NHCH ₂] ₄ C (n=0-5)	(38) - (42)	~50
[Neu5Ac-Gab-Ad-Gly ₇ -NHCH ₂] ₄ C	(48)	0.1
[Neu5Ac-Ap-Ad-Gly _n -NHCH ₂] ₄ C (n=0-3)		200
[Neu5Ac-Gab-AC-Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	(45)	7
[Neu5Ac-Gab-AC ₂ -Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	(46)	0.3
[Neu5Ac-Gab-AC ₃ -Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	(47)	0.1
[Neu5Ac-Gab-Ad-AC ₂ -Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	(43)	0.1
[Neu5Ac-Gab-Ad-AC ₃ -Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	(44)	0.04

Influenza virus A/Duck/Alberta/60/67 H12N5

3'SL		20
[3'SL-NHCOCH ₂ NH-Ad-Gly ₅ -NHCH ₂] ₄ C	(50)	1
[3'SL-NHCOCH ₂ NH-Ad-Gly ₇ -NHCH ₂] ₄ C	(51)	0.1

Beispiel 11

Inhibition der Complement-abhängigen Zytotoxizität von menschlichen Blutseren gegenüber PK 15 Zellen durch das Aggregat $\{[B_{df}-Ap-Ad-AC_3-Gly_5-NHCH_2]_4C\}_x$ (49)

Verdünnungsserien des B-Disaccharides Gal α 1-3Gal und des Aggregats $\{[B_{df}-Ap-Ad-AC_3-Gly_5-NHCH_2]_4C\}_x$ (49) mit menschlichem Blutserum wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, und die Inhibition der Zytotoxizität wurde, wie in der Literatur beschrieben, nachgewiesen (R.Rieben, E.von Allmen, E.Y.Korchagina, U.E.Nydegger, F.A.Neethling, M.Kujundzic, E.Koren, N.V.Bovin, D.K.C.Cooper, *Xenotransplantation*, 2, 98, 1995). Nach Zugabe der Complement-Bestandteile in Form von 10%

Kaninchen-Serum (Sigma) wurden die Proben 10 Minuten lang mit auf Terasaki-Platten gezogenen PK15-Zellen inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen gewaschen und mit einem Zytotoxizitätskit ("live/dead" viability/cytotoxicity kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) angefärbt. Durch Messung der Fluoreszenz-Intensitäten wurden die lebend/tod-Anteile bestimmt. Die Inhibition der Zytotoxizität wurde im Vergleich zu einer Serum-Probe, der keine Inhibitoren zugesetzt waren, berechnet. Bei folgenden Konzentrationen (berechnet als molare Konzentration der B-Disaccharid-Einheiten) wurde eine Inhibition der Zytotoxizität um 50% erreicht:

Gal α 1-3Gal (B-Disaccharide)	200 μ M
$\{[B_{di}-Ap-Ad-AC_3-Gly_5-NHCH_2-]_4C\}_x$ Aggregat (49)	0.5 μ M

Beispiel 12

Die divalenten Matrizen der Formel $[HCl-Gly_n-NHCH_2CH_2-]_2$ ($n = 2, 4$) wurden ausgehend von 1,4-Diaminobutan analog der Synthese in Beispiel 4 hergestellt.

Herstellung von Bis -1.4-(hexaglycilamido)-butan $[HCl-Gly_5-NHCH_2CH_2-]_2$ (52).

Zu einer Lösung von 30 mg der Verbindung $[HCl-Gly_4-NHCH_2CH_2-]_2$ (48.6 μ M) in 0.5 ml DMSO wurden 48 mg BocGlyGlyNOS (146 μ M) und 0.1 ml Et_3N zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein Niederschlag bildete. Nach Zugabe von 1 ml Wasser wurde der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt, dreimal in jeweils 1ml MeOH suspendiert und nochmals abzentrifugiert. Nach Trocknen im Vakuum wurde der Rückstand mit 0.5 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach zwei Stunden wurden zweimal jeweils 3 ml Toluol zugegeben und die Lösung eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und nach Zugabe von 0.1 ml einer 2 M HCl-Lösung bis zur Trockne eingedampft. Das Produkt wurde mittels Gelchromatographie über eine Sephadex LH-20 Säule (1x30 cm) mit einer 50%igen wässrigen Acetonitril-Lösung erhalten. Nach Gefriertrocknung der Produktfraktion erhielt man 26 mg (63%) der Verbindung (52).

^1H -NMR Spektrum in D_2O (δ , ppm): 1,455 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3,172 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{N}$), 3,856, 3,872, 3,947, 3,960, 3,975 und 4,028 (s, 2H, COCH_2N).

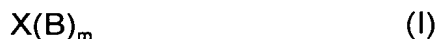
Das Aggregat $\{[\text{Neu5Ac}\alpha\text{-OCH}_2(p\text{-C}_6\text{H}_4)\text{NHCOCH}_2\text{NH-CO(CH}_2)_2\text{CO-(NHCH}_2\text{CO)}_2\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{-}]_2\}_x$ (*Ammonium-Salz*) $\{[\text{Neu5Ac-Gab-Ad-Gly}_5\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{-}]_2\}_x$ (53) wurde analog der Verbindung (48) in Beispiel 7 hergestellt.

Ausbeute 72%.

^1H -NMR Spektrum in D_2O (δ , ppm): Matrix: 1,470 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,649 (m, 4H, COCH_2CH_2), 2,363 (m, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2$), 3,181 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{N}$), 3,869, 3,941, 3,962, 3,977 (x3) und 4,045 (s, 2H, COCH_2N), 4,505 und 4,727 (d, 2H, J 11 Hz, ArCH_2), 7,415 (m, 4H, Ar). Neu5Ac α -Fragment : 1,680 (dd, 1H, J_4 12 Hz, H-3ax), 2,036 (s, 3H, NAc), 2,773 (dd, 1H, J_{3ax} 12,5 Hz, J_4 4,6 Hz, H-3 α q), 3,598 (dd, 1H, J_9 9 Hz, H-7), 3,636 (dd, 1H, J_3 6 Hz, H-9b), 3,695 (ddd, 1H, J_5 9,8 Hz, H-4), 3,728 (dd, 1H, J_7 1,5 Hz, J_5 10,2 Hz, H-6), 3,782 (ddd, 1H, H-8), 3,822 (dd, 1H, H-5), 3,846, (dd, 1H, $J_{9\beta}$ 12 Hz, J_3 2,3 Hz, H-9a).

Patentansprüche

1. Verbindung der allgemeinen Formel (I)



wobei

X für eine m-wertige Einheit steht und die

B gleich oder verschieden sind und für K-R stehen,

wobei

K für eine zweiwertige Molekülkette, und

R für Wasserstoff, einen zur spezifischen Bindung an einen Rezeptor geeigneten Liganden, ein Marker-Molekül oder eine katalytisch aktive Gruppe steht, und

m mindestens 2 ist,

mit der Maßgabe, dass

(1) in der Verbindung mindestens ein R nicht Wasserstoff ist,

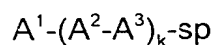
(2) mindestens zwei K vorliegen, und

(3) X, die B und m so gewählt sind, dass eine intermolekulare Assoziation der K in flüssiger Phase unter Ausbildung von Aggregaten, die auf der Oberfläche mehrere R präsentieren, die nicht Wasserstoff sind, möglich ist, und

(4) die Molmasse des Fragments $X(K)_m$ weniger als 20.000 beträgt.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Molmasse des Fragments $X(K)_m$ weniger als 4.000 beträgt.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei K in der Formel (I) für



steht, wobei

A^1 für $(CH_2)_t Y(CH_2)_u$ steht, wobei

Y für $>C=O$, $>NH$, $-O-$, $-S-$ oder eine Bindung,

t für eine ganze Zahl von 0 bis 6 und

u für eine ganze Zahl von 0 bis 6 steht,

A^2 für $-NHCO-$, $-CONH-$, $-OCONH-$ oder $SCONH-$ steht,

A^3 für $(CH_2)_r$, $O(CH_2)_r$, $NH(CH_2)_r$, $S(CH_2)_r$, oder

$-(CHQ)-$ steht, wobei

r für eine ganze Zahl von 1 bis 6 und

Q für eine substituierte oder unsubstituierte Alkyl- oder Aryl-Gruppe steht,

sp für einen zweiwertigen Spacer oder eine Bindung steht, und

k für eine ganze Zahl von 5 bis 100 steht.

4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei

m für eine ganze Zahl von 2 bis 4 steht,

X für CH_{4-m} , NH_{3-m} , N^+H_{4-m} , $>P-$ (wenn $m = 3$), $>P^+<$ (wenn $m = 4$), $>B-$ (wenn $m = 3$), eine lineare Atomgruppe C_2H_{6-m} , $>CH(CH_2)_zCH<$, $>C=C<$, $>N-N<$, $>N(CH_2)_zN<$ wobei $z = 2 - 6$, wenn $m = 4$), eine carbocyclische Atomgruppe C_6H_{6-m} , C_6H_{12-m} , oder eine heterocyclische Atomgruppe C_3N_3 (wenn $m = 3$), C_4N_2 (wenn $m = 4$) steht.

5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei mindestens 3 K vorliegen.

6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei mindestens zwei R nicht Wasserstoff sind.

7. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei mindestens drei R nicht Wasserstoff sind.

8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die intermolekulare Assoziation auf der Bildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen beruht.
9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Ligand R ein Mono- oder Oligo-Saccharid, ein Peptid, ein Mono- oder Oligo-Nukleotid oder eine Nuklein-Base ist.
10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, das Saccharid R = Sialinsäure, Sialyllactose, Sialyllactosamin, Lactose, Mannose, Gal α 1-3Gal, Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal, GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal, Neu5Ac α 2-6GalNAc, SiaLe^A, SiaLe^X, HSO₃Le^A, HSO₃Le^X, Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc, Gal α 1-3Gal β 1-4Glc, HSO₃GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc, N-Acetyl-lactosamin oder Polylactosamin ist.
11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei
 - m für eine ganze Zahl von 2 bis 4 steht,
 - X für CH_{4-m},
 - A¹ für CH₂,
 - A² für NHCO,
 - A³ für CH₂,

 - k für 8,
 - sp für (CH₂)₃CONHCH₂CONHC₆H₄-4-CH₂O- und
 - R für Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc steht.

12. Aggregat der allgemeinen Formel (II):



wobei die X(B)_m gleich oder verschieden sein können und für eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert ist, stehen, und

n für 2 bis 100.000 steht,

und wobei die $X(B)_m$ nicht-kovalent gebunden sind.

13. Aggregat nach Anspruch 12 mit linearer, zyklischer, polyzyklischer, polyedrischer, kugelförmiger oder dendritischer Struktur.
14. Aggregat nach Anspruch 12 oder 13 aus zwei oder mehreren verschiedenen Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
15. Verfahren zur Herstellung eines Aggregats wie es in einem der Ansprüche 12 bis 14 definiert wird, durch Selbstassoziation von Verbindungen nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 11.
16. Verfahren nach Anspruch 15, umfassend bei einer Lösung der Verbindung eine Änderung des pH, der Temperatur oder eine Zugabe von organischen Lösungsmitteln.
17. Verfahren zur Änderung der Struktur der Aggregate wie sie in einem der Ansprüche 11 bis 14 definiert werden, das umfasst eine Änderung der Temperatur, des pH oder eine Zugabe von Harnstoff, Trifluorethanol oder von Peptiden.
18. Verfahren zur Verstärkung der spezifischen physiologischen Aktivitäten von Molekülen durch ihren Einbau als Rest R in eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert wird bzw. in ein Aggregat der allgemeinen Formel (II) wie es in einem der Ansprüche 12 bis 14 definiert wird.
19. Mittel, umfassend eine Verbindung wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert wird bzw. ein Aggregat wie es in einem der Ansprüche 12 bis 14 definiert wird zur Anwendung in therapeutischen oder diagnostischen Verfahren.

20. Mittel nach Anspruch 20 gegen Entzündungen, virale und bakterielle Infektionen, Influenza-Viren, Selektin-vermittelte Entzündungsprozesse, Tumor-Metastasen, oder zur Neutralisation von Antikörpern bei Autoimmunerkrankungen und Transplantationen.
21. Verwendung einer Verbindung wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert wird bzw. eines Aggregats wie es in einem der Ansprüche 12 bis 14 definiert wird, zur Herstellung eines Medikaments gegen Entzündungen, virale und bakterielle Infektionen, Influenza Viren, Selektin-vermittelte Entzündungsprozesse, Tumor-Metastasen, oder zur Neutralisation von Antikörpern bei Autoimmunerkrankungen und Transplantationen.
22. Verwendung einer Verbindung wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert wird bzw. eines Aggregats wie es in einem der Ansprüche 12 bis 14 definiert wird, zur Herstellung von funktionalisierten molekularen Oberflächen.
23. Verwendung einer Verbindung wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert wird bzw. eines Aggregats wie es in einem der Ansprüche 12 bis 14 definiert wird, in einem analytischen Verfahren.
-
24. Verwendung nach Anspruch 23 in einem diagnostischen Verfahren.
25. Verbindung der allgemeinen Formel (III),



(III)

wobei

X für eine m-wertige Einheit steht und die

B gleich oder verschieden sind und für K-H stehen,

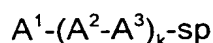
wobei

K für eine zweiwertige Molekülkette, und

m mindestens 2 ist,
mit der Maßgabe, dass

- (1) X, die B und m so gewählt sind, dass eine intermolekulare Assoziation der K in flüssiger Phase, insbesondere unter wässrigen Bedingungen, unter Ausbildung von Aggregaten, möglich ist, und
- (2) die Molmasse des Fragments $X(K)_m$ weniger als 20.000, insbesondere weniger als 4000, beträgt.

26. Verbindung nach Anspruch 25, wobei K in der Formel (III) für



steht, wobei

A^1 für $(CH_2)_tY(CH_2)_u$ steht, wobei

Y für $>C=O$, $>NH$, $-O-$, $-S-$ oder eine Bindung,

t für eine ganze Zahl von 0 bis 6 und

u für eine ganze Zahl von 0 bis 6 steht,

A^2 für $-NHCO-$, $-CONH-$, $-OCONH-$ oder $SCONH-$ steht,

A^3 für $(CH_2)_r$, $O(CH_2)_r$, $NH(CH_2)_r$, $S(CH_2)_r$ oder

$-(CHQ)-$ steht, wobei

r für eine ganze Zahl von 1 bis 6 und

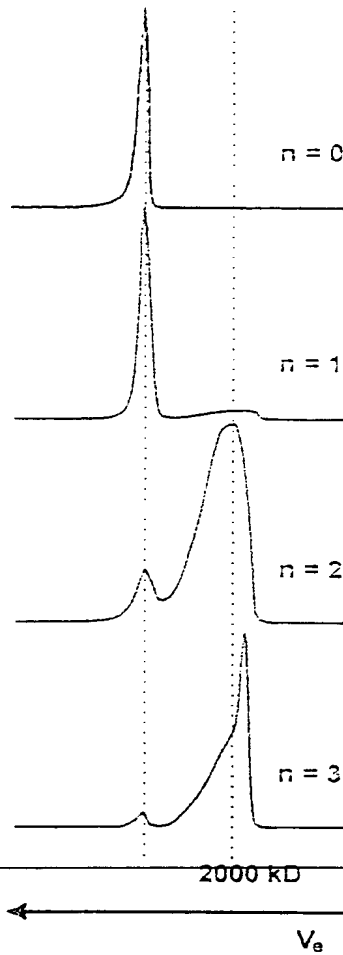
Q für eine substituierte oder unsubstituierte Alkyl- oder Aryl-Gruppe steht,

sp für einen zweiwertigen Spacer oder eine Bindung steht, und

k für eine ganze Zahl von 5 bis 100 steht.

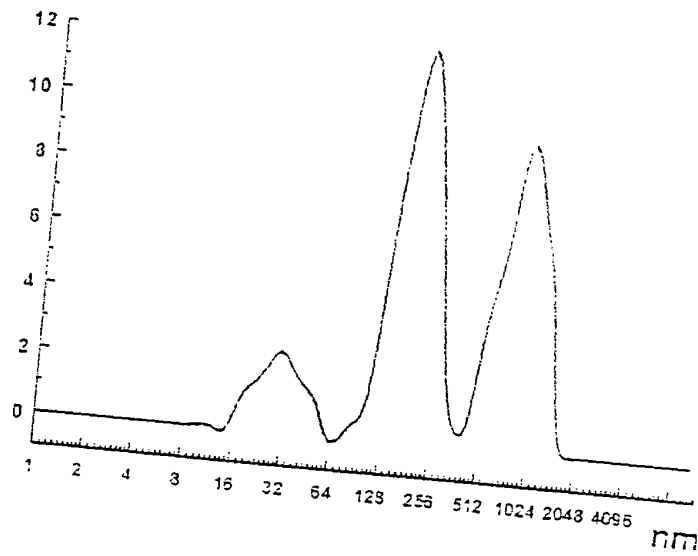
27. Verwendung einer Verbindung der allgemeinen Formel (III) nach einem der Ansprüche 25 oder 26 zur Modifikation eines Aggregats, wie es in einem der Ansprüche 12 oder 13 definiert ist.

Figur 1



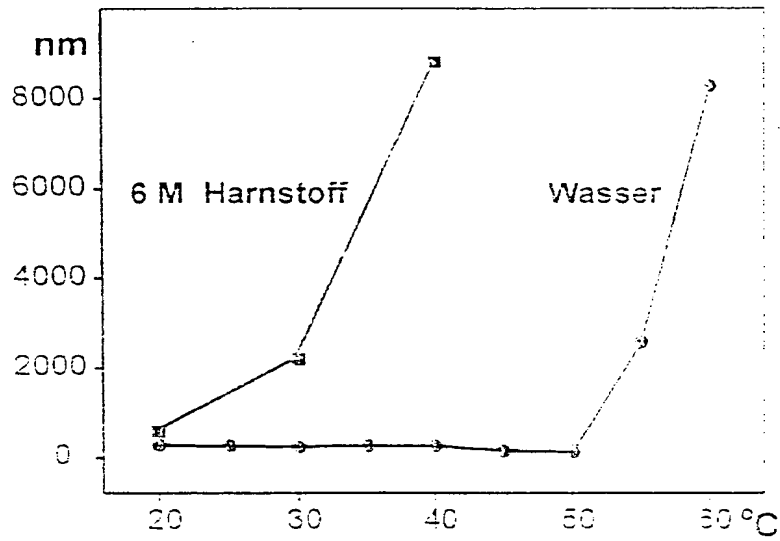
Elutionsprofile der Aggregate $\{[\text{Neu5Ac-Gab-AC}_n\text{-Ad-Gly}_5\text{-NHCH}_2\text{-}^{14}\text{C}]_x\}$,
HPLC, TSK-4000, 0.2 M NaCl

Figur 2



Relative Partikelgrößenverteilung des Aggregats
([Neu5Ac-Gab-Ad-AC₃-Gly₅-NHCH₂-¹⁴C]_x, 20°C H₂O)

Figur 3



Einfluss der Temperatur und der Anwesenheit von Harnstoff auf die Partikelgröße des Aggregats (Neu5Ac-Gab-Ad-Gly₇-NHCH₂-)_x